

Aus der Klinik für Urologie und Kinderurologie
der Philipps-Universität Marburg
- Geschäftsführender Direktor: Univ.- Prof. Dr. R. Hofmann–
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg
in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH
Standort Marburg

Evaluation der immunologischen und antineoplastischen Eigenschaften von
immunstimulativer DNA (CpG-ODN) beim Transitionalzellkarzinom.
Untersuchungen zur Zytokinexpression am orthotopen, murinen
Harnblasenkarzinommodell



INAUGURAL-DISSERTATION

zur
Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Corinna Nora Simon

aus Dresden

Marburg, 2009

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:
24.11.2009

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Univ.-Prof. Dr. M. Rothmund

Referent: PD Dr. A. Hegele

1. Koreferent: Prof. Dr. Brehm

Meinen Eltern in Dankbarkeit

1	Einleitung	1
1.1	Einführung	1
1.2	Das Harnblasenkarzinom	3
1.2.1	Epidemiologie und Inzidenz	3
1.2.2	Ätiologie und Risikofaktoren	3
1.2.3	Pathologie	5
1.2.4	Klassifikation	6
1.2.5	Klinik und Diagnostik	9
1.2.6	Therapie	11
1.2.7	Prognose und Nachsorge	17
1.3	Immunologische Grundlagen	20
1.3.1	Das Immunsystem	20
1.3.2	Zytokine – Herkunft und Funktion	26
1.3.3	CpG-Oligodeoxynukleotide (CpG-ODN)	28
1.4	Fragestellung	33
2	Material und Methoden	34
2.1	Zelllinie	34
2.2	Zellkultur	34
2.2.1	Medium- und Zellaufbereitung	35
2.2.2	Mediumwechsel und Zellumsetzung	35
2.2.3	Zellzählung	36
2.3	Tiermodell	36
2.3.1	Haltung	36
2.3.2	Narkose	37
2.3.3	Katheterisierung	38
2.3.4	Instillation	38
2.3.5	Versuchsgestaltung	39
2.4	Labormethodik und Durchführung	42
2.4.1	RNA-Extraktion	42
2.4.2	Reverse Transkriptions - Polymerase Kettenreaktion (RT- PCR)	44

2.4.3	Real-Time PCR	50
2.4.4	Auswertung	54
3	Ergebnisse	57
3.1	Allgemeine Beobachtungen	57
3.2	Klinische Daten der Tierversuche	57
3.2.1	Gruppenstärke	58
3.2.2	Gewichtsverlauf	59
3.2.3	Hämaturie	60
3.3	Ergebnisse der Real-Time PCR	61
3.3.1	Ergebnisse der Real-Time PCR im Blasengewebe	64
3.3.2	Ergebnisse der Real-Time PCR im Lymphknotengewebe	76
3.3.3	Vergleich der Expressionswerte zwischen Blasen- und Lymphknotengewebe	88
4	Diskussion	91
5	Zusammenfassung	102
6	Literaturverzeichnis	106
7	Anhang	129
7.1	Abkürzungsverzeichnis	129
7.2	Lebenslauf	132
7.3	Liste der akademischen Lehrer	135
7.4	Danksagung	137
7.5	Ehrenwörtliche Erklärung	138

1 Einleitung

1.1 Einführung

Das Harnblasenkarzinom stellt nach dem Prostatakarzinom den zweithäufigsten, malignen Tumor des Urogenitaltraktes in Westeuropa und der USA dar (Kirkali et al, 2005). 2004 erkrankten in Deutschland rund 28.750 Menschen und rund 4000 Betroffene versterben jedes Jahr an diesem Karzinom (Robert-Koch-Institut, 2008).

Neben den operativen Behandlungsmöglichkeiten des Blasenkarzinoms, die von der transurethralen Elektroresektion (TUR) bis hin zur radikalen Zystektomie reichen, stellt die intrakavitäre Behandlung mit immunstimulatorischen und zytostatischen Medikamenten eine effektive Maßnahme zur Rezidivprophylaxe des nicht-muskelinvasiven Blasenkarzinoms dar. Bei den aggressiven Formen des nicht-muskelinvasiven Blasenkarzinoms mit hohem Rezidiv- und Progressionsrisiko (v.a. pTis, pT1G3) hat sich die intravesikale Instillation von *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) als Standardtherapie etabliert. Dabei handelt es sich um einen attenuierten Stamm des *Myobacterium bovis*, der in seiner Virulenz abgeschwächt ist und primär zur aktiven Immunisierung gegen Tuberkulose eingesetzt wurde (Jocham et al, 2003).

Bei genauerer Untersuchung des Wirkmechanismus von BCG entdeckte man definierte Sequenzen in der bakteriellen DNA, sog. CpG-Motive, die wesentlich für die immuntherapeutischen Eigenschaften des BCG's verantwortlich sind. Es handelt sich hierbei um Basensequenzen mit einem zentralen, nicht-methylierten Cytosin-Guanin (CG-)Motiv. Es konnte nachgewiesen werden, dass es durch diese DNA-Sequenzen, sowohl *in-vitro* als auch *in-vivo*, zu einer ausgeprägten Th₁-gewichteten Immunantwort kommt, die über Aktivierung des angeborenen und erworbenen Immunsystems zu einer antineoplastischen Wirkung führt (¹Tokunaga et al, 1984).

Seit diesen Entdeckungen Mitte der 80er Jahre stehen die CpG-Motive, vor allem in den Bereichen Immunologie und Onkologie, im Mittelpunkt verschiedener Forschungsprojekte.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit untersuchen wir die Wirkung synthetisch hergestellter CpG-Oligodeoxynukleotide (CpG-ODN) am orthotopen, murinen Transitionalzellkarzinom-Modell (TCC).

Mithilfe von molekularbiologischen Methoden wird die Zytokinexpression im murinen Harnblasen- und Lymphknotengewebe verglichen, dabei wird zwischen Tieren, die mit CpG-Oligodeoxynukleotiden behandelt wurden, oder keinerlei Behandlung erhielten, unterschieden.

1.2 Das Harnblasenkarzinom

1.2.1 Epidemiologie und Inzidenz

Insgesamt entfallen 3% aller bösartigen Tumore auf das Harnblasenkarzinom. 90-95% der Karzinome der Harnblase sind Urothelkarzinome. Ausserdem kommen Plattenepithelkarzinome, Adenokarzinome und andere seltene Tumore (Urachuskarzinome, kleinzellige Karzinome u.a.) vor, die insgesamt jedoch selten (5%) sind.

Das Blasenkarzinom ist der vierthäufigste Tumor des Mannes und steht an sechster Stelle der malignen Neoplasien bei Frauen (Hautmann et al, 2006), wobei Männer etwa dreimal häufiger betroffen sind. Das mittlere Erkrankungsalter liegt beim männlichen Geschlecht bei 71 Jahren und bei 74 Jahren beim weiblichen Geschlecht (Robert-Koch-Institut, 2008).

Die Neuerkrankungsrate liegt in Deutschland bei fast 30.000 Fällen pro Jahr und ist in den letzten Jahren stetig angestiegen. Die Inzidenz liegt für Männer bei 38/100 000 Einwohner und für Frauen bei 11/100 000 Einwohner. Warum ein geschlechtsspezifischer Unterschied in Bezug auf die Inzidenz des Blasenkarzinoms vorliegt, ist bisher unklar. Es wird angenommen, dass die berufsbedingte Exposition mit verschiedenen kanzerogenen Chemikalien eine Ursache sein könnte (Robert-Koch-Institut, 2008).

1.2.2 Ätiologie und Risikofaktoren

Bereits Ende des 19. Jahrhunderts stellte der Chirurg Rehn den Zusammenhang zwischen Exposition von Anilinfarbstoffen bei Industriearbeitern und dem Auftreten von Harnblasenkrebs fest, etwa 50 Jahre später gelang dieser Nachweis dann im tierexperimentellen Modell (Kausch et al, 2007).

Da das Urothel der ableitenden Harnwege permanent über den Urin mit exogen zugeführten Kanzerogenen bzw. deren Metaboliten in Kontakt kommt, vermutet man hierin eine Ursache des Urothelkarzinoms.

Zu den bekanntesten Karzinogenen des Urothelkarzinoms gehören die aromatischen Amine (u.a. 1-Naphthylamin, Benzidin, Fuchsin, Nitrosamine).

Dabei ist die berufliche Exposition von potentiellen Karzinogenen zu beachten. So sind Arbeiter in der chemischen Industrie, Farb-, Aluminium- und Textilindustrie einem erhöhten Erkrankungsrisiko ausgesetzt. Aufgrund der großen Latenzzeit des Blasenkarzinoms (bis zu 20 Jahren) ist daher ein besonderes Augenmerk auf die langfristige Berufsanamnese zu legen (Jocham et al, 2003).

Einen weiteren wichtigen Risikofaktor stellt der Zigarettenkonsum dar. Raucher erkranken dreimal häufiger als Nichtraucher, und es ist davon auszugehen, dass bis zu 60% aller Blasenkarzinome auf Nikotinabusus zurückzuführen sind. Je länger der Konsum besteht, desto höher ist das Risiko der Tumorentstehung (Zeegers et al, 2004).

Weiterhin gelten bestimmte Zytostatika (z. Bsp.: Cyclophosphamid) als kanzerogen, ebenso wie die chronische Infektion der Blase.

Plattenepithelkarzinome treten gehäuft auf bei Patienten mit neurogenen Blasenentleerungsstörungen, rezidivierenden Zystitiden, Blasensteinen und Langzeit-Dauerkathetereinlage auf, ursächlich ist dabei die persistierende Schleimhautirritation.

Insbesondere für die chronische Infektion mit *Schistosoma haematobium* und dem daraus resultierendem Krankheitsbild der Schistosomiasis (Bilharziose) ist die Assoziation zur Genese des Plattenepithelkarzinoms der Harnblase nachgewiesen (Jocham et al, 2003).

Neben den genannten Risikofaktoren spielt auch die Kombination verschiedener Faktoren (männliches Geschlecht, hohes Alter und Nikotinabusus) bei der Entstehung des Harnblasenkarzinoms eine Rolle, weiterhin werden iatrogene Risikofaktoren (z. Bsp.: Strahlentherapie im Bereich des kleinen Beckens) sowie die genetische Disposition diskutiert, welche jedoch bisher nicht sicher bewiesen werden konnte (von Knobloch et al, 2004).

Man geht heute davon aus, dass es sich bei der Entstehung dieses Karzinoms um ein multifaktorielles Geschehen handelt. Es bedarf des Zusammenwirkens

mehrerer (endogener und exogener) Faktoren über einen langen Zeitraum, bevor es tatsächlich zur Initiierung kommt. Man spricht in diesem Fall von einer Plurikarzinogenese (Ganten et al, 2002; Jocham et al, 2003).

1.2.3 Pathologie

Das Blasenkarzinom ist eine Erkrankung mit stark variierendem Erscheinungsbild (Abbildung 1). Durch verschiedene Proliferationsprozesse kann es zu unterschiedlichen Wachstumsmustern des Blasengewebes kommen. Dies hat zur Folge, dass sowohl bei der Diagnostik als auch bei der Behandlung und Nachsorge individuelle Vorgehensweisen angewandt werden müssen.

Allgemein unterscheidet man zwischen gut- und bösartigen Neubildungen. Als Ausgangspunkt kommen epitheliale und mesenchymale Gewebe in Betracht, wobei 90% dieser Karzinome epithelialen Ursprungs sind, sich also vom Urothel ableiten. Sie finden sich meist in der Blase (92,5%) und treten häufig multifokal auf (Janes et al, 2008).

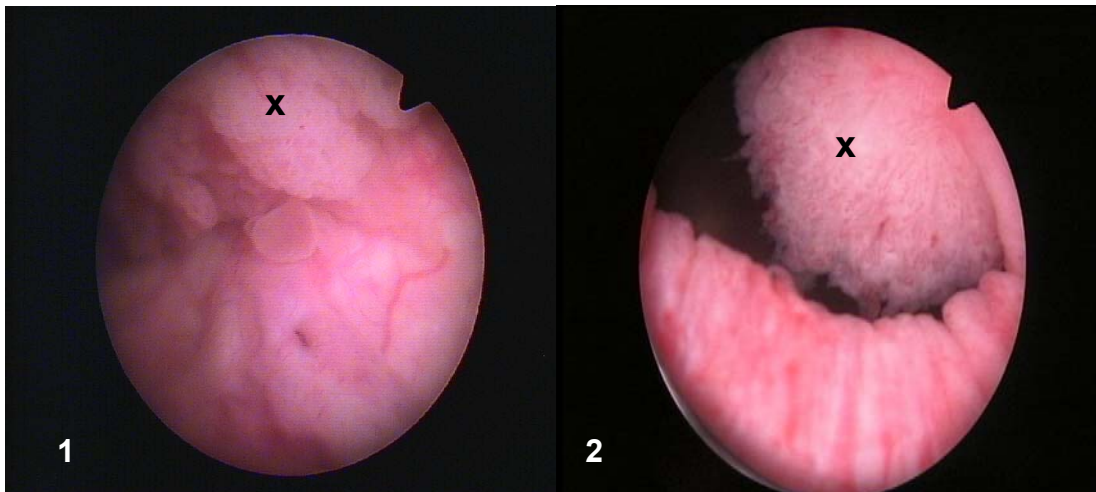


Abbildung 1: Zystoskopische Darstellung eines exophytischen Tumors am linken Harnleiterostium (1) und am Blasenausgang (2) (x= Tumor)
(aus: Hegele et al, 2005)

Neben der Unterscheidung des Ursprungsgewebes lässt sich das Urothelkarzinom anhand seines Wachstums differenzieren. Man unterscheidet zwischen papillären und soliden Tumoren, es kommen aber auch ulzerierende Formen vor. Eine Sonderform bildet das Carcinoma in situ (Cis).

Abzugrenzen von den Primärtumoren (von der Blase selbst ausgehend) sind sekundäre Tumoren, die die Blase von außen infiltrieren oder sich als Metastasen in der Blase manifestieren (Ganten et al, 2002).

Die Pathogenese des Karzinoms gliedert sich in verschiedene Stufen. Es kommt zunächst zur Zellhyperplasie (Zellvermehrung), die sich fokal oder diffus darstellen kann und zur Verbreiterung des Urothels führt. Im Verlauf treten dann Zellkernveränderungen unter Zunahme der Kernatypien auf und es entsteht das Bild der Urotheldysplasie. Man unterteilt die Dysplasie in drei Schweregrade (D I-III), wobei mit zunehmender Manifestation der Dysplasie (D II und D III) die Zellkernatypien (z.B.: Anisomorphie, Hyperchromasie) zunehmen (Jocham et al, 2003).

1.2.4 Klassifikation

Die Stadieneinteilung des Harnblasenkarzinoms erfolgt anhand der Tumor-Nodes-Metastases-(TNM-) Klassifikation der Union Internationale contre le Cancer (UICC), die das lokale und organüberschreitende Tumorwachstum beschreibt.

In Abhängigkeit der Infiltrationstiefe des Karzinoms werden die Stadien pTis - pT4 beschrieben, wobei „p“ die histopathologische Begutachtung des Gewebes anzeigt. Die „N“-Kategorie beschreibt den Befall der Lymphknoten und der Zusatz „M“ das Vorliegen von Metastasen (Tabelle 1, Abb. 2).

T		Primärtumor
Tx		Primärtumor nicht beurteilbar
T0		Kein Anhalt für einen Primärtumor
Ta		Nicht invasives-papilläres Karzinom
Tis		Carcinome in situ: "flat tumor"
T1		Tumor infiltriert subepitheliales Bindegewebe
T2		Tumor infiltriert die Muskulatur
	T2a	Tumor infiltriert die oberflächliche Muskulatur (innere Hälfte)
	T2b	Tumor infiltriert die tiefere Muskelschicht (äußere Hälfte)
T3		Tumor infiltriert das perivesikale Fettgewebe
	T3a	Mikroskopisch
	T3b	Makroskopisch
T4		Tumor infiltriert benachbarte Organe
	T4a	Infiltration von Prostata, Uterus oder Vagina
	T4b	Infiltration der Becken- oder Abdominalwand

N		Regionäre Lymphknoten (LK)
NX		Nicht beurteilbar
N0		keine LK-Metastasen
N1		solitäre LK befallen $\leq 2\text{cm}$
N2		multiple LK befallen $\geq 2\text{cm}$, $\leq 5\text{cm}$
N3		solitär/multipel $\geq 5\text{cm}$

M		Fernmetastasen
MX		Nicht beurteilbar
M0		keine Fernmetastasen
M1		Fernmetastasen

Tabelle 1: TNM-Klassifikation des Blasenkarzinoms

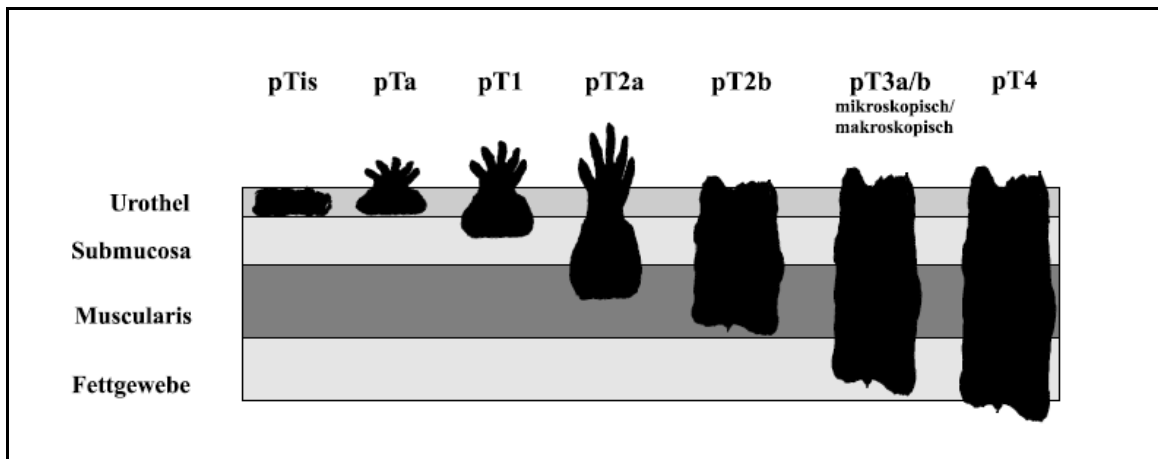


Abbildung 2: Histologische Einteilung des Urothel-CA (modifiziert nach Flam et al, 2002)

Die reiche Versorgung der Blasenmuskulatur mit Blut- und Lymphgefäßen begünstigt eine frühe lymphogene und hämatogene Metastasierung (Ganten et al, 2002; Böcker et al, 2004; Jones et al, 2008).

In mehr als 70% der Lymphknotenmetastasen ist die Obturatoriusgruppe betroffen, es folgen die Lymphknoten entlang der Arteria iliaca externa und an dritter Stelle die Lymphknoten an der Arteria iliaca communis.

Fernmetastasen finden sich vor allem in Lunge, Leber und Skelettsystem, wobei ihr Auftreten mit der Zunahme des Tumorstadiums korreliert. Andere Metastasierungsorte können das Zentralnervensystem und die endokrinen Organe (Schilddrüse und Nebenniere) sein (Jocham et al, 2003; Kausch et al, 2007).

Ergänzt wird die TNM-Klassifikation durch das histopathologische Grading, welches den Differenzierungsgrad des Tumors beschreibt, ausserdem wird die Einteilung in low- und high-grade Karzinome vorgenommen. Im Jahre 2004 wurden die „Grading-Kriterien“ von der WHO überarbeitet, deren Anwendung allerdings kritisch beurteilt wird und noch Gegenstand der Diskussion ist (Oosterlinck et al, 2007). In Tabelle 2 sind beide Modelle für das Grading des nicht-muskelinvasiven Harnblasenkarzinoms dargestellt.

G	WHO-Grading 1973
GX	Nicht beurteilbar
G1	gut differenziert
G2	mäßig differenziert
G3	Schlecht differenziert
G4	Undifferenziert/anaplastisch

WHO-Grading 2004
Urotheliales Papillom
papilläre urotheliale Neoplasie mit niedrig malignem Potential (PUNLMP)
"Low-grade" papilläres Urothelkarzinom
"High-grade" papilläres Urothelkarzinom

Tabelle 2: WHO-Grading-Kriterien 1973 und 2004

Eine Sonderform des Blasenkarzinoms bildet das Carcinoma in situ (Cis). Dabei handelt es sich um eine aggressive Form des nicht-muskelinvasiven Blasenkarzinoms mit flachem Wachstum. Die UICC definiert das Cis wie folgt: „[...] Anaplasie des Urothels ohne exophytisches Wachstum und Infiltration [...]“ Es gilt heute als obligate Vorstufe eines invasiven Urothelkarzinoms (Flam et al, 2002). Histologisch lassen sich große, unregelmäßige Zellkerne mit hohem Chromatingehalt, sowie vermehrte Mitosen erkennen. Der Tumor ist schlecht differenziert (G3) und macht 5% aller nicht-muskelinvasiven Blasenkarzinome aus. Das Cis ist als sehr aggressiv einzustufen und hat ein 80%iges Progressionsrisiko (Hermanek and Sobin, 2002).

1.2.5 Klinik und Diagnostik

Leitsymptom des Blasenkarzinoms ist in 75% der Fälle die schmerzlose (Mikro- oder Makro-)Hämaturie. 30% der Patienten berichten über dauerhafte oder intermittierende Dysurie, Pollakisurie und Urgesymptomatik, die jedoch nicht mit der Größe des Tumors korreliert. Mit Fortschreiten der Erkrankung kann sich eine Verschlechterung des Allgemeinzustandes in Form von Flankenschmerzen, Gewichtsabnahme und Anämie, einstellen.

Im Rahmen der Anamnese ist das Auftreten von Lymphödemen, Knochenschmerzen, sowie Husten mit Auswurf als Zeichen der Metastasierung zu erfragen (Jocham et al, 2003; Hautmann et al, 2006).

Die klinische Diagnostik beinhaltet neben einer ausführlichen Anamnese die sorgfältige körperliche Untersuchung. Dazu gehört u.a. die Palpation beider Nierenlager und des Unterbauchs, sowie die rektale Untersuchung des Mannes bzw. die rektale und vaginale Untersuchung der Frau.

Im Rahmen der Labordiagnostik ist neben Blutbild und Gerinnungsstatus, das Serumkreatinin als Parameter der Nierenfunktion zu bestimmen. Ebenso sollte die Urinanalyse und -Zytologie erfolgen. Ein zuverlässiger Tumormarker im Serum oder Urin existiert derzeit noch nicht (Ganten et al, 2002; Hegele et al, 2003; Oosterlinck et al, 2007).

In Hinsicht auf die bildgebende Diagnostik empfiehlt die Europäische Gesellschaft für Urologie (EAU) in ihren aktuellen Leitlinien folgende Verfahren (Tabelle 3):

Nicht-muskelinvasives Karzinom	Muskelinvasives Karzinom
• Transabdominal-Ultraschall der Blase+Nieren	Lokale Ausbreitung/Präoperativ:
• Intravenöses Urogramm	• MRT ("fast dynamic contrast enhancement") ODER
• Computertomographie des Abdomens	• Kontrastmittel-MDCT (multidetector row- CT)
Bei bestehender B-Symptomatik:	Nachgewiesener muskelinvasiver Tumor:
• Röntgen-Thorax	• MDCT Thorax, Abdomen, Becken
• Knochenszintigraphie	• MDCT-Urographie (Beurteilung der oberen Harnwege) → falls nicht verfügbar: • Röntgen-Thorax • Ausscheidungsurogramm

Tabelle 3: EAU-Leitlinien zum Einsatz bildgebender Verfahren beim Harnblasen-CA
(nach Babjuk et al, 2008)

Im Bereich der invasiven Diagnostikverfahren kommen die Urethrozystoskopie und die transurethrale Resektion der Blase (TUR-B) zum Einsatz.

Mithilfe der Urethrozystoskopie erfolgt die Beschreibung des Tumors hinsichtlich Lokalisation, Grösse, Anzahl und Erscheinungsbild, sowie die Beurteilung der gesamten Blasenmukosa.

Die TUR-B ermöglicht bei kleinen Tumoren (< 1cm) die vollständige Resektion mit darunterliegender Blasenwand. Bei grösseren Tumoren erfolgt die fraktionierte Resektion, inklusive der darunterliegenden Muskelschichten, ausserdem werden Biopsien aus anderen suspekten Arealen entnommen (Babjuk et al, 2008). In gleicher Sitzung sollte zusätzlich die bimanuelle Palpation erfolgen, um einen organüberschreitenden Tumor (T4) zu erfassen (Fossa et al, 1991; Wijkstrom et al, 1998). Für das weitere Vorgehen ist dann die histopathologische Befundung entscheidend (Babjuk et al, 2008).

1.2.6 Therapie

Die Mehrheit der Patienten (75%) weist bei Erstdiagnose ein nicht-muskelinvasives Karzinom (Ta, Tis, T1) auf. In 20% der Fälle wird ein muskelinvasives Tumorstadium (T2-4) diagnostiziert, während bei 5% der Betroffenen das Karzinom bereits metastasiert ist.

70% der nicht-muskelinvasiven Tumoren rezidivieren in den ersten zwei Jahren nach erfolgter Behandlung, wovon sich 10-20% zu einem muskelinvasiven Karzinom entwickeln (Heney, 1992; Amling, 2001).

Insgesamt ist das Tumorstadium für die Therapie des Harnblasenkarzinoms ausschlaggebend (Jocham et al, 2003).

1.2.6.1 Therapie der nicht-muskelinvasiven Blasenkarzinome

Im Falle eines nicht-muskelinvasiven Karzinoms (pTa, pT1) erfolgt die TUR-B mit kurativer Zielsetzung. Da sich in bis zu 80% der Fälle eine Tumorpersistenz nach primärer TUR-B zeigt, ist bei Patienten mit intermediärem oder hohem Rezidiv- und Progressionsrisiko eine Nachresektion indiziert (Oosterlinck et al, 2002; Schips et al, 2002).

Agrund dieser hohen Risiken hat sich die intravesikale Instillationsprophylaxe mit immunstimulativen und chemotherapeutischen Agenzien durchgesetzt. Durch eine frühzeitige postoperative Instillation (in den ersten 24 Stunden) soll eine erneute Tumorzellimplantation vermieden und die Zeit bis zum Rezidiv verlängert werden.

Die Europäische Gesellschaft für Urologie (EAU) gibt Empfehlungen für die Rezidiv- und Prophylaxetherapie, stratifiziert nach den einzelnen Risikogruppen (Tabelle 4).

Risikogruppe		EAU-Empfehlungen
Definition		
Niedrig	Unilokuär, Ta, G1 Tumor < 3 cm	1. primäre komplette TUR-B 2. Frühinstillation eines Chemotherapeutikums
Intermediär	Ta, T1, G1-2 multilokulär Tumor > 3cm	1. primäre komplette TUR-B 2. Frühinstillation eines Chemotherapeutikums 3.(optional) Re-TUR-B 4. Adjuvante intravesikale Chemo- oder Immuntherapie (BCG)
Hoch	T1 G3, Cis multilokulär rasches Rezidiv	1. primäre komplette TUR-B 2. Frühinstillation eines Chemotherapeutikums 3. Re-TUR-B 4. Adjuvante intravesikale Immuntherapie mit BCG (Erhaltungsschema) oder radikale Zystektomie bei Versagen der BCG-Therapie

Tabelle 4: Empfehlungen der EAU zur Behandlung des oberflächlichen Blasenkarzinoms
(modifiziert nach Oosterlinck et al, 2007; Babjuk et al, 2008)

1.2.6.2 Therapie des muskelinvasiven Blasenkarzinoms (pT2-pT4)

Im Falle eines muskelinvasiven Tumors (ab Stadium pT2) ist die radikale Zystektomie mit pelviner Lymphadenektomie die derzeitige Standardtherapie (Böhle et al, 1997; Jakse et al, 2007). Außerdem ist diese Verfahrensweise bei rezidivierendem oder BCG-resistentem Cis, sowie bei ausgedehntem oberflächlichem Befall der Blase, der durch die TUR-B nicht beherrscht werden kann, indiziert (Oosterlinck et al, 2007).

Beim Mann werden zusätzlich Prostata und Samenblase entfernt, ausserdem erfolgt bei Befall der prostatistischen Harnröhre oder bei Tumorbefall der urethralen Resektionskante zusätzlich die Urethrektomie.

Bei weiblichen Patienten entnimmt man neben der Harnblase den Uterus, sowie die Vaginalvorderwand und die Urethra, sofern keine orthotope Harnableitung geplant ist.

Die wichtigsten Möglichkeiten der Harnableitung sind in Abbildung 3 dargestellt.


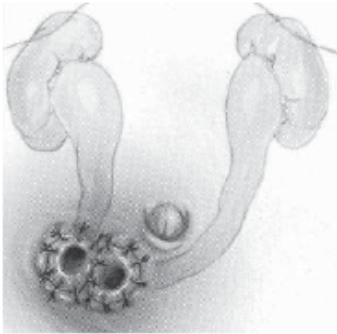
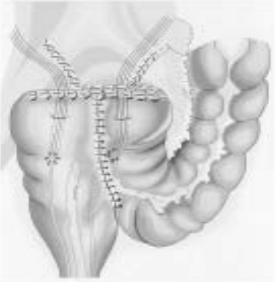
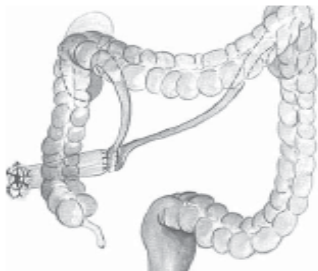
Kontinente Harnableitung	Inkontinente Harnableitung
Orthotope Ileumneoblase 	Ureterokutaneostomie 
Sigma-Rektum-Pouch 	Ileum- / Colon- Conduit 

Abbildung 3: Möglichkeiten der operativen Harnableitung nach Zystektomie
(modifiziert nach Albers & Heidenreich, 2006; Rödder et al, 2008)

Besteht beim Patienten aufgrund hoher Komorbidität eine absolute Kontraindikation oder lehnt der Patient die Operation ab, stellt die kombinierte Radiochemotherapie eine alternative Behandlungsmöglichkeit dar (Jocham et al, 2003).

Im Falle eines fortgeschrittenen Karzinoms mit erfolgter Metastasierung (M1), ist die systemische Chemotherapie die einzige Therapie, die einen Überlebensvorteil bringt (Sternberg et al, 1985). Die in den EAU-Leitlinien empfohlenen Kombinationstherapien sind in Tabelle 5 dargestellt.

First-line-Chemotherapie	GC (Gemcitabin, Cisplatin) MVAC (+ GCSF) (Methotrexat, Vinblastin, Adriamycin, Cisplatin)
Second-line-Chemotherapie	Einzelsubstanzen (z.Bsp.: Paclitaxel, Docetaxel) ODER Paclitaxel/Gemcitabine

Tabelle 5: EAU-Leitlinien zur Chemotherapie beim fortgeschrittenen, metastasierten Harnblasenkarzinom (GCSF=Granulozyten Kolonie-stimulierender Faktor) (modifiziert nach Oosterlinck et al, 2007; Babjuk et al, 2008)

Multimodale Therapieansätze zur Verbesserung der Prognose bei lokal fortgeschrittenen Tumoren oder in metastasierten Stadien sind Gegenstand der klinischen Forschung.

Die palliative Therapie fortgeschrittener Stadien muß neben der Beherrschung tumorbedingter Komplikationen auch die Verbesserung der Lebensqualität zum Ziel haben (AWMF-Leitlinie Nr. 043/016).

1.2.6.3 Intravesikale Instillationstherapie

Wie bereits erwähnt, haben die nicht-muskelinvasiven Blasenkarzinome eine hohe Rezidiv- und Progressionstendenz. Daher existieren verschiedene Konzepte zur Verminderung der Rezidivhäufigkeit. Die Rezidivprophylaxe durch intravesikale Instillation von Medikamenten spielt hierbei die tragende Rolle (Siehe Tabelle 4).

Chemotherapeutika

Zur Instillationstherapie mit einem Zytostatikum kommen lokale Chemotherapeutika zum Einsatz, wie z.Bsp. Mitomycin C, Doxorubicin, Epirubicin (Sylvester et al, 2006; Oosterlinck et al, 2007).

Bei Karzinomen der Niedrig-Risikogruppe ist eine einmalige Frühinstillation ausreichend, während bei Tumoren mit intermediärem Risiko die Langzeitprophylaxe mit Mitomycin C oder Epirubicin induziert ist (Sylvester et al, 2004; Murta-Nascimento et al, 2007).

50% der Patienten erleiden darunter, aufgrund der lokalen Toxizität der eingesetzten Substanzen, leicht- bis mässiggradige Nebenwirkungen.

BCG (Bacillus Calmette-Guérin)

Zu Beginn des 20. Jahrhunderts entwickelten Calmette und Guérin den Lebendimpfstoff BCG aus *Mycobakterium bovis*, der seit 1921 als zuverlässige Prävention gegen die Tuberkulose eingesetzt wird (Böhle et al, 1997).

1929 entdeckte Pearl die antitumorale Wirkung der Tuberkulose, er beobachtete, dass Tuberkulosepatienten seltener an Malignomen erkrankten als Nichtinfizierte (Pearl, 1929). 1976 berichtete die Arbeitsgruppe um Morales über die ersten klinischen Erfolge von BCG beim Harnblasenkarzinom im Rahmen von intravesikalen und intrakutanen Therapieversuchen (Morales et al, 1976). Später konnte Ratliff zeigen, dass die immunmodulatorische Wirkung des BCG's nur in Zusammenhang mit einem intakten Immunsystem funktioniert (Ratliff et al, 1987).

Bis heute hat sich BCG als erfolgreichste Option der Rezidivprophylaxe beim nicht-muskelinvasiven Blasenkarzinom, vor allem bei Hochrisikotumoren entwickelt. Der genaue Wirkmechanismus ist jedoch noch nicht vollständig verstanden (Jocham et al, 2003).

Im Vergleich zum ursprünglichen *Mycobakterium-bovis*-Stamm unterscheidet sich der heute verwendete BCG-Impfstoff durch seine fehlende Virulenz. Eingesetzt werden vitale, lyophilisierte BCG-Keime in standardisierter Dosierung, die bei intravesikaler Instillation eine lokale Entzündung erzeugen. Es kommt zum massiven Einstrom immunkompetenter Zellen wie Granulozyten, Lymphozyten, Makrophagen und Dendritische Zellen (DC's) (Böhle et al, 1990). Diese Zellen sezernieren unter der Stimulation von BCG proinflammatorische Zytokine, vor allem Interleukin-12 (IL-12) und Interferon- α (IFN- α), die als entscheidende Faktoren der BCG-induzierten Zelltoxizität gelten. Neben der Zunahme der Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), sezernieren BCG-aktivierte-Killerzellen (BAK) Perforin, welches schließlich zur Tumorzellyse führt.

Im murinen orthotopen Blasenkarzinommodell führt die intravesikale BCG-Therapie zur erhöhten Expression von Interferon, während Interleukin-4 (IL-4) deutlich geringer ausgeschüttet wird. Es resultiert also ein Th₁-gewichtetes Zytokinmilieu (McAveny et al, 1994; De Boer et al, 2003).

Weiterhin lassen sich im murinen Modell nach BCG-Instillation Zytokine der Th₁- und Th₂-gewichteten Immunantwort (Interleukin-5, Interleukin-10) im Urin nachweisen. Das Vorkommen des typischen Th₂-Zytokins Interleukin-4 (IL-4) kann jedoch nicht belegt werden (McAveny et al, 1994).

Histologisch zeigen sich suburotheliale Granulome, die noch bis zu einem Jahr nach der BCG-Therapie nachweisbar sind und auf eine langfristige Aktivierung des Immunsystems hindeuten (Böhle et al, 1996; Suttman et al, 2006).

In vergleichenden Studien mit Chemotherapeutika zeigt BCG eine höhere Effektivität mit gleichzeitigem Einfluss auf die Tumorprogression. In der Nachbeobachtungszeit von 2,5 Jahren ist die Progression bei Anwendung von BCG um 4% verringert. Besonders Patienten mit Cis profitieren von dieser Therapie (Lamm et al, 2000; Sylvester et al, 2002).

Liegt ein Karzinom mit hohem oder intermediärem Risiko vor, wird die topische Immuntherapie mit BCG angewandt (Vgl. Tabelle 4) und stellt heute die Standardtherapie des Cis und aller oberflächlichen G3-Tumoren dar (Sylvester et al, 2004).

BCG ist jedoch auch bei lokaler Applikation relativ toxisch. Es kann zu Fieber, Dysurie, Infektionen des Urogenitalsystems, sowie Pneumonie und Hepatitis kommen. Des Weiteren besteht durch diese Behandlung fast immer eine so genannte „BCG-itis“, also eine durch BCG ausgelöste Zystitis, welche ggf. auch eine systemische Symptomatik auslösen kann (s.u.). Je nach Ausprägung kann dies zu mangelnder Patientencompliance bis hin zu Therapieabbrüchen führen.

Bei 5% der Patienten treten schwere Nebenwirkungen auf, so dass BCG abgesetzt werden muss und gleichzeitig eine tuberkulostatische Therapie mit simultaner Gabe hochdosierter Cortikosteroide erforderlich ist (Lamm et al, 1989).

Gerade die Erhaltungs BCG Therapie, die 24-36 Monate erfolgen sollte, weist eine hohe Nebenwirkunsrate auf und verlangt die intensive und individuelle Begleitung des Patienten (Jocham et al, 2003).

1.2.7 Prognose und Nachsorge

Die Prognose des Harnblasenkarzinoms korreliert mit dem T-Stadium, dem Differenzierungsgrad und dem Befall der Lymphknoten (Tabelle 6). Weitere prognostisch relevante Faktoren sind multifokales Wachstum, begleitende Urotheldysplasie sowie zusätzliches Cis (Böhle et al, 1997; Millán-Rodríguez et al, 2007).

Nicht-muskelinvasives Blasenkarzinom	Rezidivwahrscheinlichkeit (%)		Progressionsrate (%)	
	1 Jahr	5 Jahre	1 Jahr	5 Jahre
Niedrig	15-24	31-46	<1	<1-6
Intermediär	24-38	46-62	<1-5	<1-17
Hoch	24-61	46-78	1-17	6-45

Tabelle 6: Progressions- und Redizivwahrscheinlichkeit des oberflächlichen Blasenkarzinom (modifiziert nach Sylvester et al, 2006; Oosterlinck et al, 2007)

Bei muskelinvasiven Tumoren wird die 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit zwischen 40 - 60% angegeben und hat sich in den letzten Jahren nicht verändert. Je nach Tumorstadium ergeben sich ohne präoperative Therapie bei alleiniger radikaler Zystektomie unterschiedliche Überlebenszeiten (Tabelle 7). Es zeigt sich ausserdem, dass Tumorstadium und Lymphknotenbefall die einzigen verwertbaren prognostischen Marker darstellen, um eine Aussage für das Überleben zu treffen (Pagano et al, 1991; Bassi et al, 1999).

Tumorstadium	pT1	pT2	pT3	pT4
5-Jahres-ÜLR	75%	63%	31%	21%

Tabelle 7: 5-Jahresüberlebensrate (5-Jahres-ÜLR) ohne präoperative Behandlung

Nach erfolgreicher Ersttherapie ist die onkologische Nachsorge entscheidend, da gerade die nicht-muskelinvasiven Karzinome hohe Rezidivraten aufweisen. Bei den invasiven Karzinomen sind erfolgte Therapie und Tumordifferenzierung für die Nachsorge ausschlaggebend (Jakse et al, 2007). Tabelle 8 beinhaltet die Nachsorgeempfehlungen der EAU für die invasiven und nicht-invasiven Karzinome der Harnblase.

- Einleitung -

Tumorstadium		Nachsorge
Nicht-Muskelinvasives Karzinom	Niedriges Risiko	Zystoskopie 3 Monate post-TUR-B wenn negativ → 9 Monate post-TUR-B " " → jährliche Zytoskopie über 5 Jahre
	Hohes Risiko	Zystoskopie 3 Monate post-TUR-B wenn negativ → Zystoskopie aller 3 Monate über 2 Jahre " " → Zytoskopie aller 4 Monate im 3. Jahr " " → Zytoskopie aller 6 Monate bis zum 5. Jahr " " → dann jährliche Zystoskopiekontrolle
	Intermediäres Risiko	Individuelles Schema aus Anteilen der Nachsorge für niedriges und hohes Risiko → individuell planen
Muskelinvasives Karzinom	Nach Zystektomie	Erste Konsultation 3 Monate postoperativ beinhaltet: - körperliche Untersuchung - Laboruntersuchung (Serumkreatinin, BGA) - Urinanalyse - Ultraschall der Nieren, Leber und Retroperitoneum - Röntgen-Thorax Wiederholung alle 4 Monate
	Nach Radiotherapie	Erste Konsultation 3 Monate nach Therapieende beinhaltet: - körperliche Untersuchung - Laboruntersuchung (Serumkreatinin, BGA) - Urinanalyse - Ultraschall der Nieren, Leber und Retroperitoneum - Zystoskopie und Urinzytologie - Becken-CT - Röntgen-Thorax

Tabelle 8: Empfehlungen der EAU zur Nachsorge des Blasenkarzinoms
(modifiziert nach Jakse et al, 2007; Oosterlinck et al, 2007)

1.3 Immunologische Grundlagen

1.3.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem (lat.: immunis = frei, unberührt) ist ein komplexes System bestehend aus verschiedenen zellulären und humoralen Komponenten, durch deren Interaktion es gelingt, den Körper vor Krankheitserregern und körpereigenen entarteten Zellen (z.Bsp.: Tumorzellen, virusinfizierte Zellen) zu schützen. Es ist also in der Lage zwischen „harmlos“ und „gefährlich“ sowie zwischen „eigen“ und „fremd“ zu unterscheiden.

Das Immunsystem besteht aus zwei Armen, dem angeborenen (unspezifischen) und dem adaptiven (spezifischen) Immunsystem. Hierbei kann aber nicht von einer strikten Trennung beider Systeme gesprochen werden, vielmehr sind sie über verschiedene Mechanismen verbunden und interagieren miteinander. Dieses Phänomen wird in der Literatur als „crosstalk“ bezeichnet (Abbildung 4).

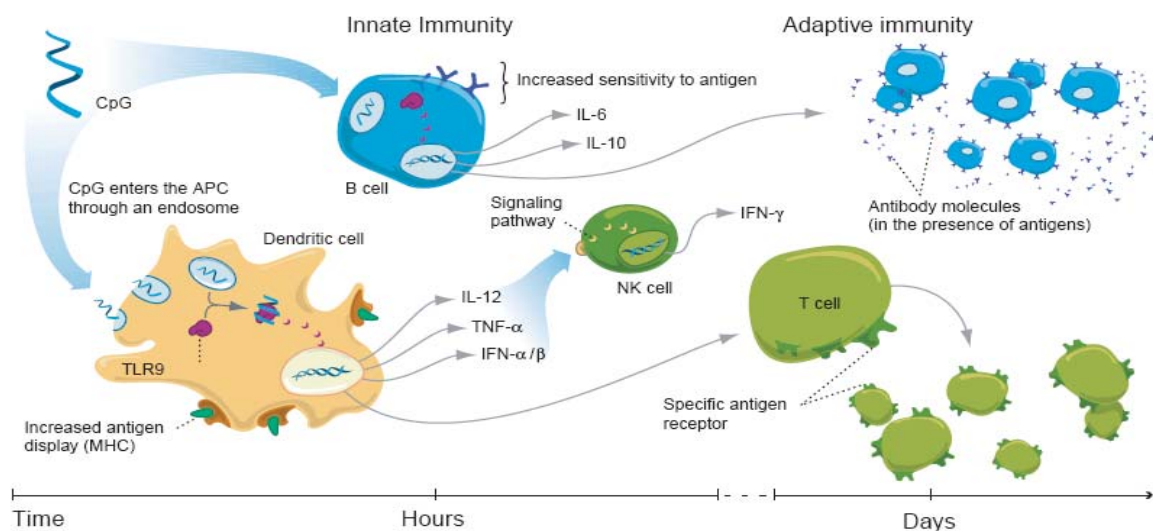


Abbildung 4: Crosstalk des Immunsystems. Über Stimulation (z. Bsp.: durch CpG-ODN) erfolgt zunächst die Aktivierung des angeborenen Immunsystems und Schaffung eines Th₁-spezifischen Zytokin- und Mediatorenmilieus. Die sekundär aktivierten NK-Zellen gewinnen lytische Aktivität. B-Zellen werden durch Antigenpräsentation stimuliert und exprimieren kostimulatorische Moleküle. Das wiederum führt zur Aktivierung der T-Zellen (modifiziert nach Krieg, 2003).

Das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem stellt die erste Abwehrstation des Körpers dar. Es reagiert schnell und unspezifisch und dämmt Pathogene so lange ein, bis das adaptive Immunsystem greift. Allerdings ist es nicht in der Lage eine Gedächtnisfunktion aufzubauen.

Die Differenzierung zwischen körpereigenen und –fremden Strukturen erfolgt im Kontext mit spezifischen Präsentationsmolekülen, die als Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex = MHC) bezeichnet werden und sich in zwei Gruppen gliedern.

MHC-Klasse I Moleküle finden sich, mit Ausnahme der Erythrozyten, auf allen Körperzellen und präsentieren vor allem körpereigene Peptide. Außerdem präsentieren virusinfizierte Zellen virale Proteine über MHC-Klasse I und werden darüber vom Immunsystem identifiziert.

Die MHC-Klasse II Moleküle hingegen, werden nur von den antigen-präsentierenden Zellen (APZ), Makrophagen und den dendritischen Zellen (DC) exprimiert (Janeway et al, 2002).

Die unspezifische Immunantwort wird durch humorale und zelluläre Komponenten gewährleistet. Zu den humoralen Bestandteilen gehören u.a. das Komplementsystem und die Proteine der „akuten Phase“, zu den zellulären Bestandteilen zählen Granulozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen (DC) und natürlichen Killer Zellen (NK-Zellen). Sie identifizieren Pathogene über die Pattern-Recognition-Rezeptoren (PRRs), die spezielle molekulare Muster (sog. Pathogen-Associated-Molecular-Patterns (PAMPs)) erkennen.

Insgesamt werden drei verschiedene PRRs unterschieden: Sezernierende, Endozytotische und Signalübertragende, zu denen auch die Toll-like-Rezeptoren gezählt werden. PRRs sind in der Keimbahn genetisch determiniert und haben sich infolge des Selektionsdruckes während der Evolution herausgebildet, werden also in jeder Generation weitervererbt.

PAMPs sind in vielen Mikroorganismen vorzufinden, im körpereigenen Organismus kommen sie allerdings nicht vor (Gemsa et al, 1997; Janeway et al, 2002; Male et al, 2005).

Als wichtiger Vertreter der zellulären Abwehr sind die Natürlichen Killerzellen zu nennen. Ihre Funktion besteht in der Erkennung und Eliminierung von Zellen, die keine, wenige oder veränderte MHC-Moleküle tragen. Bei Pathogenkontakt setzen sie zytotoxische Granula frei und induzieren so den programmierten Zelltod des Pathogens. Ihre Wirkung wird durch bestimmte Zytokine, wie Interleukin-12 (IL-12), Tumornekrosefaktor (TNF- α) und Interferon- α (IFN- α) potenziert (Ljunggren et al, 1990; Moretta et al, 2002).

Trotz seiner Schnelligkeit gelingt es dem unspezifischen Immunsystem nicht, alle Pathogene vom Organismus fernzuhalten. Ist diese erste Barriere durchbrochen, setzen die Mechanismen des adaptiven Immunsystems ein.

Ein wichtiges Bindeglied zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem sind die Dendritischen Zellen (DCs). Sie exprimieren signalübertragende und endozytotische PRRs auf ihrer Oberfläche und verbessern dadurch die Antigenpräsentation. Gleichzeitig erfolgt die vermehrte Ausschüttung inflammatorischer (IL-1, IL-6, IL-8 und TNF- α) und Effektor-Zytokine (Typ-I-Interferone und IL-12), die als starke Initiatoren der T-Zell-Antwort wirken (Abbildung 5).

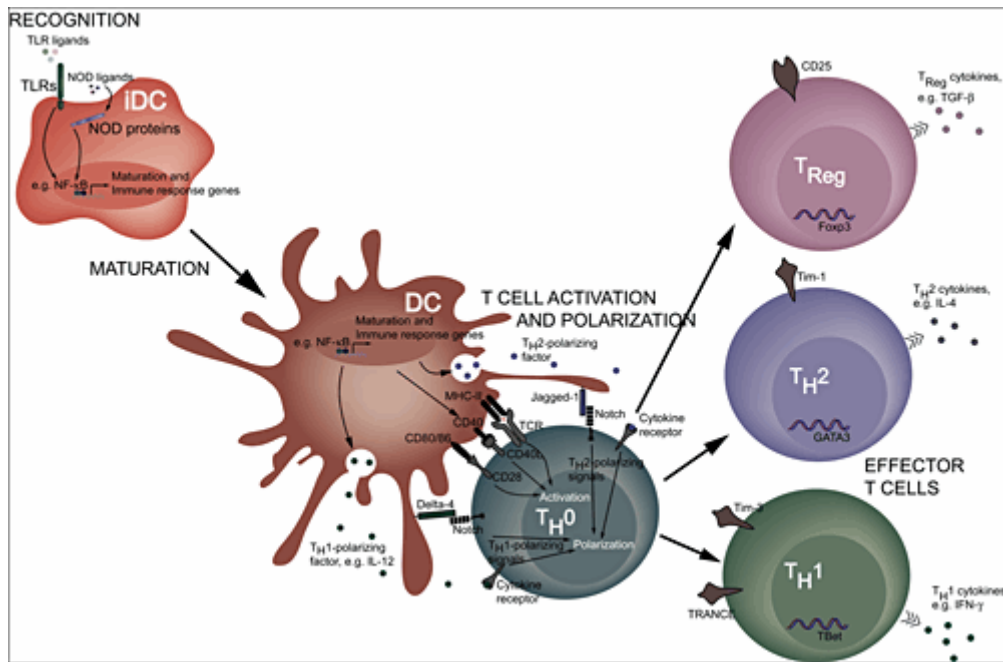


Abbildung 5: Zusammentreffen von DC und Pathogen. Durch Zytokinausschüttung kommt es zur Aktivierung verschiedener Immunzellen des adaptiven Immunsystems

(Quelle: <http://www.fz-borstel.de/cms/uploads/pics/Abbildung.gif>)

Das adaptive Immunsystem

Im Gegensatz zum angeborenen Immunsystem reagiert dieser Arm verzögert, dafür aber antigenspezifisch. Hauptakteure sind die T- und B-Lymphozyten.

T- Lymphozyten

Die Aufgabe der T-Lymphozyten bezieht sich auf die zellvermittelte Immunantwort. Ihre Entwicklung vollzieht sich im Thymus, von da gelangen sie über die Blutbahn in die peripheren lymphatischen Organe und zirkulieren dort bis sie auf ihr spezifisches Antigen treffen und dadurch zur klonalen Expansion angeregt werden (Res et al, 1999).

Innerhalb der T-Zellpopulation unterscheidet man zwischen naiven T-Zellen, die noch nicht auf das spezifische Antigen getroffen sind und T-Gedächtnis Zellen, welche bereits spezifischen Antigenkontakt hatten und einen Teil des immunologischen Gedächtnisses bilden.

Die Antigenerkennung der T-Zellen erfolgt über den T-Zell Rezeptor (TZR). Aufgrund der Vielzahl von Antigenen bedarf es einer immensen Anzahl von TZRs, um eine spezifische Reaktion zwischen diesen beiden Komponenten zu ermöglichen.

Vermittelt wird dies durch die Interaktion zwischen TZR und MHC-Molekülen. Als Kofaktor agiert dabei ein Oberflächenmolekül (entweder Clusters of Differentiation (CD) 4 oder 8), welches die Interaktion zwischen TZR und entsprechenden MHC-Molekül festlegt.

CD4-Zellen werden als T-Helferzellen bezeichnet und interagieren mit den antigenpräsentierenden Zellen (APZ). Sie haben eine zentrale Bedeutung in der Steuerung und Modulation der Immunantwort.

Dagegen erkennen CD8-Zellen spezifische Peptidantigene, welche zusammen mit MHC-Klasse I Molekülen präsentiert werden. Da aus dieser Interaktion die Zerstörung der Zielzelle resultiert, werden diese T-Zellen auch als zytotoxische T-Zellen bezeichnet (Janeway et al, 2002).

Dennoch ist die alleinige Interaktion mit einem Liganden nicht ausreichend, um eine klonale Expansion der T-Lymphozyten zu erreichen. Dafür sind andere kostimulatorische Signale der antigenpräsentierenden Zellen notwendig, da die alleinige TZR-Stimulation den Zustand der Anergie (fehlende Reaktion auf ein Antigen) induziert (Medema et al, 1999).

Bei den CD4-Zellen unterscheidet man weiterhin zwischen Th₁- und Th₂-Zellen, welche ein unterschiedliches Zytokinrepertoire produzieren.

Th₁-Zellen sind inflammatorische Zellen, welche bevorzugt die Zytokine Interferon gamma (IFN- γ) und Interleukin-2 (IL-2) produzieren und zu einer zellvermittelten Immunität führen.

Th₂-Zellen dagegen produzieren vor allem Interleukine (IL-4, IL-5, IL-10) und führen zu einer humoral geprägten Immunantwort (Muraille et al, 1998).

Bei der Differenzierung von CD4-Zellen in Th₁- und Th₂-Zellen spielen verschiedene Faktoren eine Rolle, wobei dieser Vorgang noch nicht vollständig geklärt ist. Wichtig sind allerdings die Zytokine, die während der ersten Reaktion einer naiven CD4-T-Zelle mit einem Antigen anwesend sind.

Eine Th₁- Immunantwort wird durch die Anwesenheit von IL-12 und IFN γ unterstützt, welche von Makrophagen und NK-Zellen gebildet werden (Muraille et al, 1998). Ausserdem ist Interferon- α (IFN- α) für diese Differenzierung entscheidend, welches von DC und virusinfizierten Zellen synthetisiert wird (Siegal et al, 1999; Biron et al, 1998).

Dagegen werden für die Ausbildung einer Th₂-dominierten Immunantwort die Zytokine IL-4 und IL-10 benötigt (Seder et al, 1992; Schmitt et al, 1994). Diese werden durch die Th₂-Zellen produziert und verstärken die Th₂-Differenzierung im Sinne einer positiven Rückkopplung.

Eine Th₂-Immunantwort findet sich typischerweise in der Pathogenese von Allergien. Dagegen reagiert der Körper auf intrazelluläre Krankheitserreger (z. Bsp.: Parasitäre Infektionen) mit einer Th₁-basierten Immunantwort.

Ein weiterer Faktor in der Differenzierung der CD4-Zellen ist die Antigendichte auf der Oberfläche der APZ. Je höher die Dichte des Antigens, desto früher erfolgt eine Ausbildung in Richtung einer Th₁-gewichteten Immunantwort, wohingegen eine niedrige Antigenkonzentration die Th₂-Antwort fördert (Rogers, 1998).

Insgesamt ist zu sagen, dass es im Immunsystem keine strenge Teilung zwischen Th₁- und Th₂- Immunantwort gibt. Vielmehr handelt es sich wahrscheinlich auch hier um zwei interagierende und sich gegenseitig kontrollierende Systeme, in denen IL-10 eine Schlüsselrolle zukommt (Muraille et al, 1998).

B- Lymphozyten

Die Aktivierung dieser Zellen erfolgt durch die Th₂-Zellen in den lymphatischen Geweben. Dort besteht durch die erhöhte Zelldichte gleichzeitig eine höhere Wahrscheinlichkeit, dass die antigenspezifische B-Zelle auf die entsprechende antigenspezifische Th₂-Zelle trifft.

B-Lymphozyten sind in der Lage über ihren B-Zell Rezeptor (BCR) Antigene mittels Rezeptor-vermittelter Endozytose zu binden und diese nach intrazellulärer Spaltung auf MHC-Klasse II Molekülen an der Zelloberfläche zu exprimieren.

Für die eigentliche Aktivierung der B-Zellen bedarf es neben der Bindung des TZR an den MHC-II/Peptid Komplex, der Bindung des CD40L (auf der Th₂-Zelle) an CD40, welches von den B-Zellen konsekutiv exprimiert wird. Aufgrund dieser Signale beginnt die B-Zelle mit der klonalen Expansion.

Weiterhin schütten die Th₂-Zellen vermehrt Zytokine, wie zum Beispiel Interleukin-4 (IL-4), aus. Diese bedingen die Entstehung Antikörper-sezernierende Plasmazellen und B-Gedächtnis-Zellen (B memory cells) aus den ursprünglichen B-Lymphozyten (Janeway et al, 2002, Male et al, 2005, Neumann et al, 2008).

1.3.2 Zytokine - Herkunft und Funktion

Zytokine sind lösliche Faktoren, die zu den Bestandteilen des angeborenen, unspezifischen Immunsystems gezählt werden. Man unterscheidet zwischen Interferonen (IF), Interleukinen (IL), Coloniestimulierende Faktoren (CSF), Chemokinen und Tumornekrosefaktoren (TNF). Ausserdem sezernieren verschiedene Zelltypen unterschiedliche Zytokinkombinationen, so dass oftmals mehr als ein Zytokin nötig ist, um eine Antwort zu erzeugen.

Sie können autokrin, parakrin und endokrin wirken und binden an den Zielzellen über verschiedene Rezeptoren (Gemsa et al, 1997). Kommt es zum Eindringen eines Pathogens in den Körper werden durch diverse Mechanismen Zytokine ausgeschüttet. Diese versetzen den Körper in erhöhte Bereitschaft den Keim zu bekämpfen und dienen gleichzeitig als Katalysatoren der zellulären Immunantwort. Einen Überblick über eine Auswahl verschiedener Zytokine gibt Tabelle 9.

- Einleitung -

Zytokin	Familie	Prod. Zellen	Zielzellen	Wirkung auf	Andere Wirkung
TNF-α	TNF-Familie	Monozyten	nahezu alle	erhöht die transendotheliale Wanderung	Katabole Wirkung
	Cachektin	Makrophagen DC B-Zellen T-Zellen	Körperzellen	der Leukozyten	
IL-12b	nicht zugeordnet	Monozyten	T-Zellen	Aktivierung und Differenzierung von Th ₁ -Zellen	
	natural killer cell stimulatory factor (NKSF)	Makrophagen DC B-Zellen	NK-Zellen	↑ Produktion von IFN- γ durch NK- und T-Zellen Aktivierung der NK-Zellen	
IFN-γ	Interferone	T-Zellen	Tumorzellen	Makrophagenaktivierung	Antiviral
		NK-Zellen	hämatopoet.Zellen Endothelzellen	Hemmung Th ₂ -Zellen, Erhöhung Th ₁ -Antwort ↑ zytotox. Aktivität der NK-Zellen	
IL-4	Hämatopoetine	T-Zellen	B-Zellen	Aktivierung+Wachstum von B-Zellen	
	B-cell stimulating factor (BSF-1)	Mastzellen	Th ₁ -Zellen	Hemmung von Th ₁ -Zellen Hemmung der Makrophagen Hemmung der TNF- α Prod. durch Makrophagen	
IL-10	nicht zugeordnet	T-Zellen	Makrophagen	Aktivierung+Proliferation von B-Zellen & Mastzellen	Antagonist von
	Cytokine synthesis Inhibitory factor (CSIF)	Makrophagen	Th ₁ -Zellen NK-Zellen,	Hemmung von Th ₁ -Zellen Hemmung der Zytokinausschüttung der Makrophagen (TNF- α +IFN- γ)	IL-4 und IFN- γ
TGF-β	nicht zugeordnet	Monozyten	nahezu alle	Hemmung der B- und T-Zell Proliferation	Wachstum &
		verschiedene Gewebe	Körperzellen	Hemmung der NK-Zellen	Differenzierung versch. Zellen
TH1-basierte Immunantwort		TH2-basierte Immunantwort			

Tabelle 9: Übersicht über ausgewählte Zytokin (TGF- β = Transforming-Growth-Factor- β)
(modifiziert nach Janeway et al, 2002; Male et al, 2005)

1.3.3 CpG-Oligodeoxynukleotide (CpG-ODN)

1.3.3.1 Entwicklung

Lange Zeit ging man davon aus, dass die Desoxyribonukleinsäure (DNA) „nur“ als Speicher der genetischen Information dient. Doch bereits Ende des 19. Jahrhunderts hatte William Coley die antitumoröse Wirkung von Bakterien („Coley's Toxine“) entdeckt und setzte sie erstmalig in der Behandlung von Sarkompatienten ein, ohne den Wirkmechanismus zu kennen (Kienle et Kiene, 2003). In den 1960er Jahren befasste sich die Arbeitsgruppe um Jensen mit der immunstimulatorischen Funktion von DNS (Jensen et al, 1963) und 1984 konnten Tokunaga et al eine Stimulation des Immunsystems durch Fraktionen des Bacillus Calmette-Guérin nachweisen, wobei sich dieser Effekt auf die Anwesenheit der bakteriellen DNA zurückführen liess (Tokunaga et al, 1984). Im weiteren Verlauf wurde gezeigt, dass allein die DNA von Bakterien und Viren, nicht aber die der Wirbeltiere zu dieser Stimulation fähig ist. (Yamamoto S et al, 1992)

Bakterielle oder virale DNA enthält sog. CpG-Motive. Dabei handelt es sich um unmethylierte Cytidin-Guanosin-Dinukleotide, die von bestimmten Basenpaaren flankiert werden (das „p“ bezeichnet die Phosphatbindung). Zunächst ging man davon aus, dass sich die immunstimulatorische Wirkung auf die Basenpaare zurückführen lässt. In weiteren Untersuchungen zeigte sich dann aber, dass dieser Effekt auf das unmethylierte Cytosin zurückgeführt werden kann (Gruenbaum et al, 1981; Messina et al, 1991; Messina et al, 1993).

Der Vergleich von CpG-Dinukleotiden in eukaryontischer und prokaryontischer DNA ergab, dass 70% der Cytosin Moleküle an der 5'-Position in methylierter Form beim Eukaryonten vorlagen, während sie in prokaryontischer DNA komplett unmethyliert waren. Des Weiteren zeigte sich, dass die unmethylierten CpG-Motive in der eukaryontischen DNA mit einer statistisch vorhersehbaren Häufigkeit von 1:50/1:60 vorkommen, während sie bei den Prokaryonten mit einer Häufigkeit von 1:16 vorliegen (Bird, 1986). Entfernte oder tauschte man

die 2 Basen aus (CG zu GC), verloren sie ihre stimulatorische Wirkung. Ebenso verhielt es sich, wenn das Cytosin methyliert wurde.

Es sind demnach die einzelsträngigen Oligonukleotide mit dem unmethylierten CG-Motiv, die stimulatorisches Potential besitzen (Krieg et al, 1995).

Mithilfe dieser Erkenntnis gelang auch die Erklärung, dass durch die genannten Unterschiede das unspezifische Immunsystem in der Lage ist zwischen „fremder“ und „eigener“ DNA zu unterscheiden. In weiteren Experimenten zeigte sich, dass Sequenzen, die am 3'-Ende zwei Pyrimidine und am 5'-Ende zwei Purine aufweisen, ein hohes stimulatorisches Potential haben (Krieg et al, 1995).

Hartmann und Krieg entwickelten dann das CpG-Motiv 5'-GTCGTT-3', wodurch eine optimale Stimulation des menschlichen Immunsystems erreicht werden konnte (Hartmann et al, 2000). Kurze Zeit später folgte dann durch die Arbeitsgruppe um Bauer das Motiv (5'-GACGTT-3') für das murine Immunsystem (Bauer et al, 2001). Heute verwendet man synthetische Oligodeoxynukleotide mit einer Länge von etwa 20 Basen und einem Phosphorothioat-Backbone, welches die Nukleaseresistenz der CpG-ODN erhöht.

1.3.3.2 Wirkung und Wirkmechanismen von CpG-DNA

Genau wie bestimmte Bakterienzellwandbestandteile (Peptidoglycane, Lipopolysaccharide u.a.) gehören die CpG-Oligodeoxynukleotide zu den PAMP's und wirken über das angeborene und erworbene Immunsystem. Ihr spezifischer Rezeptor der PRR-Gruppe ist der Toll-like Rezeptor 9 (TLR-9), der über den IL1/TLR- Transduktionsweg wirkt (Hemmi et al, 2000; Janeway et al, 2002).

Primär entdeckte man diese Rezeptorgruppe bei der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* und bezeichnete sie als „Toll-receptor“ (Hashimoto et al, 1988).

1997 wurde dieser Rezeptortyp dann erstmals auch bei den Säugetieren entdeckt und erhielt aufgrund seiner Ähnlichkeit zum „Toll-receptor“ die Bezeichnung „Toll-like-receptor“ (Medzhitov et al, 1997). Derzeit sind 11 TLRs im Menschen bekannt, wobei Ligand und Funktion für TLR-11 derzeit noch ungeklärt sind (Zhang et al, 2004).

TLR-9 ist wie einige andere TLRs, im Endosom der Zelle lokalisiert (Hemmi et al, 2000). Durch diese endosomale Lage müssen CpG-ODN zunächst intrazellulär aufgenommen werden. Nach erfolgter Bindung an TLR-9 wird eine Signalkaskade, bestehend aus Myeloid differentiation primary response gene 88 (MyD88), Interleukin-1-receptor-activated-kinase (IRAK) und Tumornecrosis-factor-receptor-associated-factor-6 (TRAF 6) ausgelöst (Abbildung 6). Über komplexe Aktivierungsschritte entstehen 3 Endprodukte: Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells (NF- κ B), Interferon regulatory factor 7 (IRF-7) und activator protein 1 (AP-1). Sie translozieren in den Nukleus und entfalten dort ihre Wirkung als Transkriptionsfaktoren (Muzzio et al, 2000; Kawai et al, 2006).

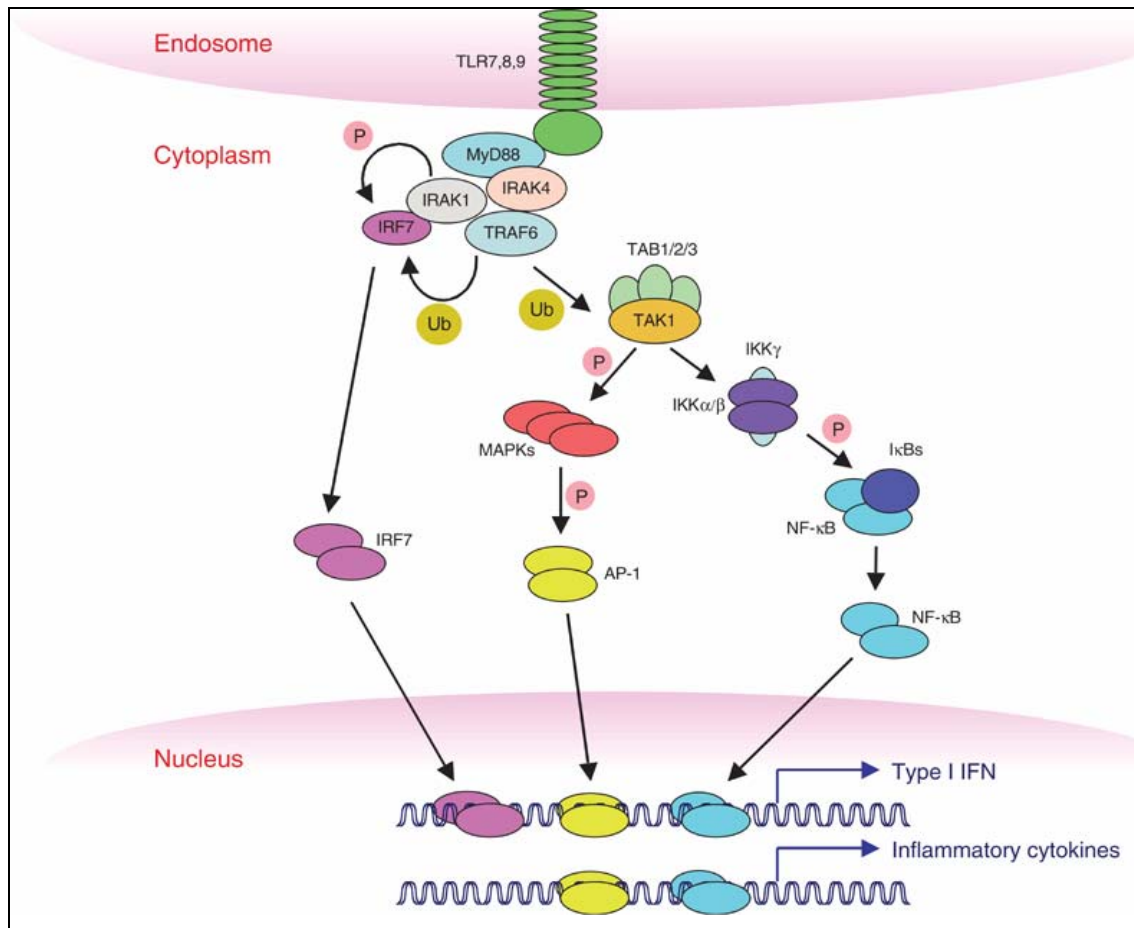


Abbildung 6: Signaltransduktion über den TLR-9 Rezeptor: CpG greifen über den endosomal lokalisierten TLR-9 an und lösen eine Signalkaskade aus, die auf die Transkription verschiedener Gene wirkt (modifiziert nach Kawai und Akira, 2006)

TLR-9 wird beim Menschen wahrscheinlich nur von B-Zellen und plasmazytoiden dendritischen Zellen (PDC) exprimiert (Krieg, 2004).

Im Mausmodell hingegen findet sich TLR-9 auch in murinen Monozyten/Makrophagen und anderen Immunzellen. Die Zellen steigern nach CpG-ODN-Aufnahme die Antigenpräsentation und erhöhen dadurch Zytokinproduktion, insbesondere für IFN, IL-12, IL-6 und TNF- α (Lipford et al, 2000).

Daraus resultiert zunächst eine erhöhte Apoptoseresistenz der PDCs und es folgt die vermehrte Expression kostimulatorischer Moleküle (CD 80, CD 86, CD 40) und des Chemokinrezeptors 7 (CCR7). Der letztgenannte Faktor initiiert die Wanderung der Zellen in die Lymphknoten und die Sekretion Th₁-spezifischer Zytokine (Janeway et al, 2002).

Die PDCs produzieren außerdem vermehrt Typ-I-Interferon, wodurch sie sich zu potenten Antigenpräsentierenden Zellen (APZ) differenzieren. Durch die ausgeprägte Produktion von Zyto- und Chemokinen werden weitere Zelltypen (myeloide dendritische Zellen, Monozyten und NK-Zellen) aktiviert.

Im zweiten Teil dieser Reaktionskaskade kommt es zur verstärkten Aktivierung des adaptiven Immunsystems. T-Zellen werden nicht direkt durch CpG-ODN stimuliert, jedoch wird durch das induzierte Zytokinmilieu die Differenzierung zu Th₁-Zellen aktiviert (Kranzer et al, 2000).

Bei den B-Zellen induziert die CpG-Stimulation durch den zeitgleichen Antigenkontakt die antigenspezifische Antikörperproduktion (Krug et al, 2001; Krieg et al, 2002). Es folgt eine verstärkte Expression von Klasse II-MHC, CD 80, CD 86 und es kommt zum Anstieg der Interleukin-6- und Interleukin-10-Produktion. Ausserdem erhöht dieser Stimulus bei humanen und murinen B-Zellen die Apoptoseresistenz und wirkt direkt stark mitogen (Yi et al, 1996; Yi et al, 1998; Yi et al, 1999; Liang et al, 1996).

1.3.3.3 CpG-Oligodeoxynukleotide und ihre Wirkung am Harnblasenkarzinom

Die Standardtherapie zur Rezidivprophylaxe von nicht-muskelinvasiven Harnblasenkarzinomen der Intermediär- und Hoch-Risikogruppe ist derzeit die intravesikale Instillationstherapie mit BCG. Untersuchungen konnten zeigen,

dass diese Therapie eine starke Th₁-Immunantwort hervorruft, die möglicherweise auch auf die CpG-Motive der bakteriellen DNA zurückzuführen ist (Tokunaga et al, 1984; ¹Böhle et al, 2003). Die intravesikale Immuntherapie mit BCG ist gerade bei Hochrisikotumoren effektiver als die Chemotherapie, hat jedoch ein ausgeprägtes Nebenwirkungs- und Toxizitätsprofil (²Böhle et al, 2003).

Aufgrund dieses Zusammenhanges wurde die Wirkung von CpG-ODN am TCC untersucht. Es zeigte sich, dass durch die Applikation von CpG-ODN im murinen subkutanen Blasenkarzinommodell systemische und lokale Effekte auftreten, welche sich durch ein klinisches und histopathologisches Ansprechen des Tumors und den histologischen Nachweis inflammatorischer Reaktionen darstellen lassen (Hegele et al, 2004).

Untersuchungen am murinen, orthotopen Harnblasenkarzinommodell ergaben, dass die singuläre topische Applikation von CpG-ODN antineoplastische Wirkung zeigt. Auch hier war die Tumorgröße signifikant verringert und histologisch zeigte sich ebenfalls eine ausgeprägte Entzündungsreaktion (Hegele et al, 2005).

Molekularbiologische Untersuchungen erbrachten, dass durch die Instillation der immunstimulativen DNA eine Mehrexpression von Th₁- und Th₂-Zytokinen nachweisbar ist (Olbert et al, 2008; Olbert et al, 2009)

Zum Anderen zeigte sich, dass die systemische Gabe von CpG-ODN bei wiederholten subkutanen Applikationen eine MB49-spezifische Immunität erwirken kann (Ninalga et al, 2005).

1.4 Fragestellung

Im Rahmen dieser Dissertation untersuchen wir die Anwendung von CpG-ODN beim orthotopen Harnblasenkarzinom am murinen Modell.

Nach Therapieende werden den Tieren die Harnblase und die benachbarten Lymphknoten entnommen und das Gewebe weitergehend untersucht.

Im Vordergrund der Untersuchung steht die Frage, welche immunologischen Mechanismen mit der nachgewiesenen antineoplastischen Wirkung der CpG-ODNs assoziiert sind. Dies soll durch Messung von Zytokinen der Th₁- und Th₂-vermittelten Immunantwort im Gewebe erfolgen.

Wir untersuchen die Expression von TNF- α , IFN- γ und IL-12b als Vertreter der Th₁-vermittelten Immunantwort, sowie IL-4, IL-10 und TGF- β als Zeichen der Th₂-basierten Immunantwort. Als Kontrollgruppe fungiert Harnblasenkarzinomgewebe aus Mäusen, die aus der gleichen Versuchsreihe stammen, aber keine Behandlung erhalten haben.

Es leiten sich daraus folgende Fragen ab:

- Existiert ein Unterschied in der Zytokinexpression zwischen CpG-behandelten und unbehandelten Mäusen mit Urothelkarzinom ?
- Handelt es sich dabei um eine Th₁-gerichtete Immunantwort bei Behandlung mit CpG-ODN, die durch Anstieg der Zytokine TNF- α , IFN- γ und IL-12b nachweisbar ist?
- Gibt es Unterschiede in der Zytokinexpression bezüglich des Therapiezeitpunktes nach der Tumorzellimplanation (frühe versus späte Behandlungsgruppe)?

2 Material und Methoden

Um eine Aussage über die Wirkung von CpG-ODN auf die Zytokinexpression beim Transitionalzellkarzinom (TCC) der Harnblase treffen zu können, erfolgt deren Testung am orthotopen Mausmodell, welches von Günther et al. entwickelt und von uns in modifizierter Form angewandt wurde (Günther et al., 1999; Günther et al., 2002).

Es werden 39 weibliche C57/BL6 Mäuse untersucht, bei denen mit einer syngenem, murinen TCC-Zelllinie (MB-49) ein orthotopes Transitionalzellkarzinom in der Harnblase induziert wird.

2.1. Zelllinie

Bei den eingesetzten Tumorzellen handelt es sich um die syngene, murine Transitionalzellkarzinomzelllinie MB49. Entwickelt und standardisiert wurde dieses Modell von Summerhayes und Franks in den 70er Jahren (Summerhayes et Franks, 1979).

2.2. Zellkultur

Chemikalien

Name	Präparat	Hersteller
D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	D-MEM+Glutamax	Gibco, BRL Life Technology Inc. (Eggenheim, D)
Fetales Kälberserum	FCS 10% - Foetal Bovine Serum Gold	PAA - The Cell Culture Company (Cölbe, D)
PBS (Phosphate buffered Saline)		PAA - The Cell Culture Company (Cölbe, D)
Penicillin-/Streptomycin-Lösung (100x)		PAA - The Cell Culture Company (Cölbe, D)
DMSO	DMSO- Dimethyl-Sulphoxide	Sigma-Aldrich-Chemie (München, D)
Trypanblau	Trypan blue	ICN Biomedical Inc. (Aurora, USA)

Geräte

Gerät	Name	Hersteller
Arbeitsbank (Bench)	Hera safe	Heraeus (Hanau, D)
Phasenkontrastmikroskop	Nikon Eclipse TE 200	Nikon (Düsseldorf, D)
Wasserbad	C-5B Julabo	Julabo Laboratories GmbH (Seelbach, D)
Wärmeschrank	Hera cell	Heraeus (Hanau, D)
Zählkammer	Zählkammer 0,0025 mm ² Neubauer	Carl Roth GmbH+CO.KG (Karlsruhe, D)
Zentrifuge	Biofuge stratos	Heraeus (Hanau, D)

2.2.1. Medium- und Zellaufbreitung

Die Substanzen für das Kulturmedium werden vorher bei 37°C im Wasserbad erwärmt. Das Medium setzt sich wie folgt zusammen:

500 ml DMEM

5,62 ml Penicillin-/Streptomycin-Lösung

56,2 ml FCS 10%

Die MB-49-Zellen werden im Wasserbad aufgetaut und im Anschluss für 5 min bei 1500 U pm zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die Zellen mit 10 ml PBS steril + 10% FCS resuspendiert. Es folgt die erneute Zentrifugation mit Verwerfung des Überstandes, wie oben beschrieben. Das gewonnene Zellpellet wird in 10 ml Kulturmedium gelöst und in eine 50 ml Kulturflasche (Cellstar®, greiner-bio-one, Frickenhausen, D) überführt. Die Aufbewahrung erfolgt im Anschluß bei 37°C unter 5% CO₂.

2.2.2. Mediumwechsel und Zellumsetzung

Ein Mediumwechsel erfolgt aller drei Tage. Einmal wöchentlich werden die Zellen gesplittet und in neue Mediumflaschen überführt. Vor jedem Wechsel/ Splitting begutachtet man das Zellwachstum und die Zellmorphologie unter dem Phasenkontrastmikroskop. Im Falle eines Mediumwechsels wird das alte Medium verworfen und 20 ml neues Medium in die Kulturflasche eingebracht. Werden die Zellen gesplittet, wird das alte Medium verworfen und der Zellrasen mit 10 ml PBS vom Boden der Kulturflasche mit der Pipettierhilfe abgespült.

Die Zellsuspension wird in ein Zentrifugengefäß (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D) gegeben und für 8 min bei 8000 U pm zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und dieser Schritt einmal wiederholt. Das gewonnene Pellet wird resuspendiert und mit einem adäquaten Volumen Zellmedium auf zwei neue Kulturflaschen aufgeteilt.

2.2.3. Zellzählung

Unmittelbar vor Beginn der Tierversuche erfolgt die Zellaufbereitung und -Zählung (Vgl. 2.2.1.). Das gewonnene Zellpellet wird mit 1 ml Medium resuspendiert, wovon dann 10 µl mit 90 µl Trypanblau vermengt werden.

Auf der Zählkammer ist ein Deckglas fixiert, um die Newtonschen Ringe sichtbar zu machen. In den oberen und unteren Bereich der Kammer pipettiert man ausreichend von dem Zell-Trypanblau-Gemisch und es folgt die Zellzählung in den vier Quadranten der Kammer unter dem Phasenkontrastmikroskop. Aus der gezählten Zellzahl wird der Mittelwert gebildet und das endgültige Volumen mit einer Zellkonzentration von 10^6 Zellen/ml berechnet. Diese Zellzahl/ml wird aus der ursprünglichen Zellsuspension entnommen und mit Medium auf 1 ml aufgefüllt.

2.3. Tiermodell

2.3.1. Haltung

Es handelt sich um weibliche C 57/Bl 6 Mäuse (20-30 g, Harlan, Borcheln, D), die im Tierstall des Biomedizinischen Forschungszentrum (BMFZ) der Universität Marburg unter SPF-Satus (spezifisch pathogen frei) in IVC-Käfigen (individually ventilated cages) gehalten werden. Der Hell-/Dunkelrhythmus beträgt 12/12 Stunden. Futter- und Trinkwasseraufnahme stehen 24 Stunden ad libitum zur Verfügung, eine antibiotische Behandlung erfolgt nicht. Während der Versuchsreihe wird jedes Tier in einem Einzelkäfig gehalten, um die Unterscheidung der einzelnen Mäuse zu ermöglichen.

Für die Durchführung der Tierversuche liegt die entsprechende Genehmigung des Regierungspräsidiums Gießen vor (Geschäftszeichen: U63-19C20-15(1)MR20/20/#28/2003).

2.3.2. Narkose

Die Durchführung aller invasiven Maßnahmen erfolgt in Narkose. Als Betäubungsmittel wird eine Lösung aus Ketaminhydrochlorid (Ketamin 100mg, CuraMED, Karlsruhe, D), Xylazinhydrochlorid (Rompun®2%, Bayer, Leverkusen, D) und steriler Kochsalzlösung (0,9%, Braun, Melsungen, D) verabreicht. Die Applikation erfolgt intraperitoneal mittels Tuberkulinspritzen (Omnifix®-F, Firma Braun, Melsungen, D) (Abbildung 7).

Es werden 0,1 mg Ketamin/0,01 mg Xylazin/g/KG eingesetzt, was zu einer ausreichenden Narkosedauer von ca. 1,5 Stunden führt.

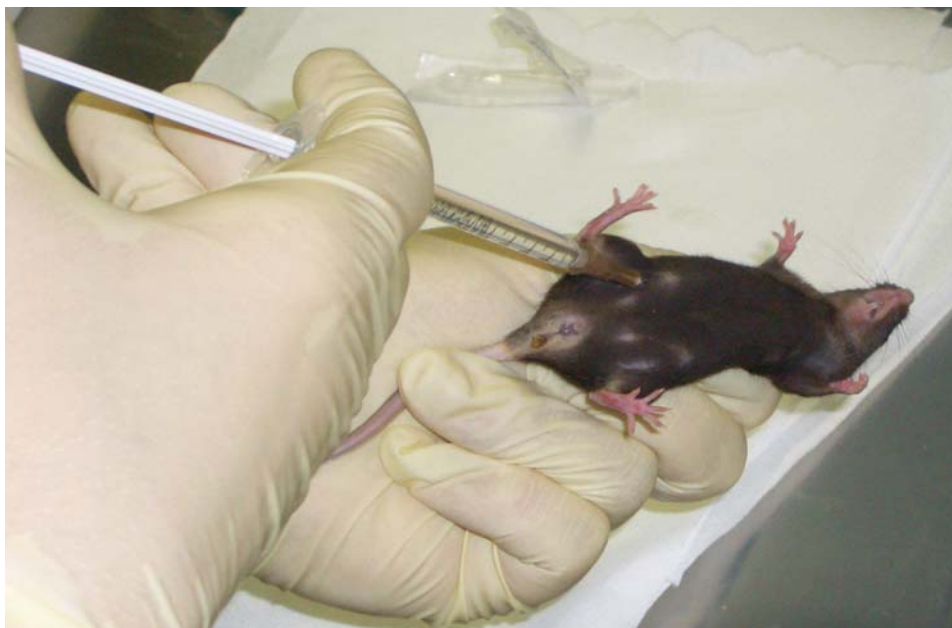


Abbildung 7: Anästhesie über intraperitoneale Injektion des Ketamin-Xylazin-Gemisches (eigenes Bildmaterial)

2.3.3. Katheterisierung

Um Tumorzellen, Poly-L-Lysin und CpG-ODN intravesikal zu verabreichen, erfolgt die Anlage eines transurethralen Katheters, dazu werden Venenverweilkanülen (24 Gauge, Intracan®, Braun, Melsungen, D) verwendet. Die Tiere werden in Rückenlage positioniert, Harnröhre und Genital mit einem Gleitmittel (Installa Gel, Farco Pharma, Köln, D) benetzt und der Katheter vorsichtig eingeführt (Abbildung 8).

Tritt nach Entfernen der Stahlkanüle Urin aus, liegt der Katheter korrekt. Allen Tieren wird an den Behandlungstagen mittels transurethraler Katheterisierung Urin entnommen, welcher für andere Versuche unserer Arbeitsgruppe verwendet wird.



Abbildung 8: Katheterisierte C57/Bl 6-Maus.

Am Ende der Katheterisierung wird der Stahlmandrin vorsichtig zurückgezogen und die korrekte Lage des Katheters geprüft (eigenes Bildmaterial)

2.3.4. Instillation

Um Tumorzellen, Poly-L-Lysin und CpG-Oligonukleotide intravesikal zu applizieren, verwendet man eine Hamilton Mikroliter®-Spritze mit einzementierter Kanüle (MICROLITER® 702/25µl, Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, D). Die Kanüle wird auf das Ende des Blasenkatheters aufgesetzt

und der Spritzeninhalt vorsichtig in die Blase eingebracht. Der Katheter wird dann mit einem Kombistopper verschlossen (Abbildung 9).

Am Ende der Instillationszeit wird der transurethrale Katheter entfernt und es entleert sich spontan das Gemisch aus Tumorzell-Suspension/ Oligonukleotid-Lösung und Urin.



Abbildung 9: Katheterisierte Mäuse nach Instillation der Tumorzelllinie MB 49
(eigenes Bildmaterial)

2.3.5. Versuchsgestaltung

Die Durchführung der Tierversuche erfolgt in drei zeitlichen Etappen, wobei jede Etappe 12 Tiere umfasst und 13 Tage dauert. Alle Tiere werden täglich auf ihre Vitalität geprüft und an jedem zweiten Tag gewogen. In jeder der Etappen werden die Tiere nach dem Zufallsprinzip drei Gruppen zugeteilt, so dass sich eine Gruppenstärke von vier Tieren pro Gruppe ergibt.

Die erste Gruppe fungiert als Kontrollgruppe (Control), sie erhält während der gesamten Versuchsdauer keine Behandlung. An jedem zweiten Tag erfolgt die Asepsis von Urin mittels Katheter. Dadurch kann die wiederholte Katheterisierung als Störfaktor der Messergebnisse ausgeschlossen werden.

Die zweite Gruppe (early onset) erhält bereits am ersten Tag nach der Instillation der Tumorzellen CpG-ODN, diese Behandlung erfolgt dann an jedem zweiten Tag.

In der dritten Gruppe (late onset) werden die CpG-ODN erst am fünften Tag nach Tumorzellinstillation eingesetzt, auch hier wiederholt sich die Behandlung alle zwei Tage. Einen Überblick über die Versuchsgestaltung gibt Tabelle 10.

TAG	CONTROL	EARLY ONSET	LATE ONSET
0	Urin/Tumorinstillation	Urin/Tumorinstillation	Urin/Tumorinstillation
1	Urin	Urin /CpG-ODN	Urin
3	Urin	Urin /CpG-ODN	Urin
5	Urin	Urin /CpG-ODN	Urin / CpG-ODN
8	Urin	Urin /CpG-ODN	Urin / CpG-ODN
10	Urin	Urin /CpG-ODN	Urin /CpG-ODN
12	Urin	Urin /CpG-ODN	Urin /CpG-ODN
13	Urin/†	Urin/†	Urin/†

Tabelle 10: Versuchsgestaltung über 13 Tage für die 3 verschiedenen Tiergruppen

2.3.5.1. Tumorinstillation

Die Tumorinduktion erfolgt am Tag null, nach der unter Punkt 2.3.4. beschriebenen Vorgehensweise.

Zunächst werden über den Blasenkatheter für 20 Minuten 50 µl Poly-L-Lysine mit einem Molekulargewicht von 50 000-70 000 Dalton (Sigma®, München, D) in einer Konzentration von 0,1 µg/µl appliziert. Der Einsatz dieses Poly-Kations fördert die Adhäsion der Tumorzellen an der Harnblasenwand. Im Anschluss wird die Blase vollständig entleert und 50 µl der aufgeschüttelten Tumorzellsuspension intravesikal appliziert, was einer Konzentration von 10^6 Zellen entspricht. Die Suspension verbleibt dann eine Stunde bei verschlossenem Katheter.

2.3.5.2. Behandlung mit CpG-Oligodesoxynukleotiden (CpG-ODN)

Je nach Behandlungsgruppe werden die CpG-ODN am ersten oder fünften Tag nach der Tumorinstillation eingesetzt. Dabei handelt es sich um PTO-modifizierte Oligonukleotide (TIB-MolBiol, Berlin, D). Die verwendete immunstimulatorische Sequenz der CpG-ODN lautet:

5'- TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT-3' (CpG 1668)

Es werden 50 µl der CpG 1668-Lösung (entspricht einer Konzentration von 10 nmol) über den Katheter mittels Hamilton Mikroliter®-Spritze in die Blase eingebracht. Nach der Applikation verbleibt das Gemisch für 45 Minuten intravesikal.

2.3.5.3. Gewebepräparation

Am 13. Tag nach Tumorinduktion werden die Tiere, nach nochmaligem Wiegen und Urinentnahme in Narkose, durch zervikale Dislokation getötet. Direkt im Anschluss folgt die Präparation der Blase und der iliakalen Lymphknoten.

Die Gewebe werden getrennt voneinander in vorgekühlte Kryotubes (Nunc Cryo Tube™ Vials, Nunc, Wiesbaden, D) gegeben und anschließend sofort in flüssigen Stickstoff. Bis zur weiteren Verarbeitung werden die Proben bei -80°C aufbewahrt. Die Zeit zwischen Tötung des Tieres und Einfrieren der Asservate beträgt weniger als zwei Minuten.

2.4. Labormethodik und Durchführung

Aus den Blasen wird die Ribonukleinsäure (RNA) extrahiert und im Anschluss in komplementäre-DNA (c-DNA) umgeschrieben. Die primäre Überprüfung der c-DNA erfolgt durch die qualitative Polymerase Kettenreaktion (PCR), deren Ergebnisse mittels Gelelektrophorese dargestellt werden. Ausserdem verwenden wir das Verfahren der Real-Time-PCR, um die Expression der gewählten Zielgene quantitativ zu erfassen.

2.4.1. RNA-Extraktion

Die Proben werden mithilfe von Trizol[®] und mehrmaligem Auswaschverfahren, gemäß den Empfehlungen des Herstellers Invitrogen Laboratories (Karlsruhe, D), verarbeitet. Das Gewebe wird in seine Bestandteile aufgetrennt, wobei nur die extrahierte RNA weiterverwendet wird. Reinheit und Konzentration der RNA werden im Anschluss mit einem UV-Photometer (260 nm/ 280 nm) gemessen.

Chemikalien

Präparat	Name	Hersteller
Chloroform	Trichlormethan/Chloroform ≥ 99%,CHCl ₃	Carl Roth GmbH+CO.KG (Karlsruhe, D)
Ethanol	Ethanol absolut	Riedel- de Haën (Seelze, D)
Isopropanol	Isopropanol (2-Propanol)	Riedel- de Haën (Seelze, D)
Nuklease-freies Wasser	Nuclease-free water	Promega (Mannheim, D)
RNAse Inhibitor	Rnasin [®] RNAse Inhibitor	Promega (Mannheim, D)
TE-Puffer (1:10) aus	10 mM TRIS (0,6055g) (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	Riedel- de Haën (Seelze, D)
	1mM EDTA (0,186g) (Ethylendiamintetraacetat)	Carl Roth GmbH+CO.KG (Karlsruhe, D)
	mit Aqua dest. auf 500ml aufgefüllt	
Trizol	Trizol [®] Reagent	Invitrogen (Karlsruhe, D)

Geräte

Gerät	Name	Hersteller
Homogenisator	Ultra-Turrax T8	IKA-Werke GmbH&CO KG (Staufen, D)
Kanülen	BD Microlances™-3	Becton Dickinson SA (Heidelberg, D)
Tuberkulin-Spritzen	BD Plastipak™-1ml	Becton Dickinson SA (Heidelberg, D)
UV-Photometer	Gene-Ray UV-Photometer	Biometra® (Göttingen, D)
UV-Photometer-Küvetten	Präzisionsküvetten aus Quarzglas-Suprasil®	Hellma® (Müllheim, D)
Zentrifuge	Biofuge fresco	Heraeus, (Hanau, D)

Durchführung

- Die Proben werden auf Eis aufgetaut, mit 1ml Trizol® versetzt und mit dem Homogenisators zerkleinert.
- Die Trizol-Gewebesuspension wird 3-5 mal durch eine Tuberkulin-Spritze mit Kanüle gezogen und danach für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.
- Nach Zugabe von 0,5 ml Chloroform wird die Mischung 15 sec kräftig in geschüttelt und dann 10 min bei Raumtemperatur inkubiert.
- Es folgt die Zentrifugation für 15 min bei 12 000 U/pm bei 4 °C.
Daraus resultiert eine Auftrennung in 3 Phasen:
 - Obere, klare Phase → Gelöste Total-RNA
 - Mittlere, weiße Phase → Proteine
 - Untere, rote Phase → Trizol-Chloroform-Gemisch
- Die obere, klare Phase wird in ein neues Eppendorfröhrchen (1,5 ml, Eppendorf AG, Hamburg, D) gegeben, mit 0,5 ml Chloroform versetzt und für 2 min kräftig geschüttelt. Im Anschluss folgt die Zentrifugation für 15 min bei 2000 U/pm und 4°C. Dieser Schritt wiederholt sich einmal.
- Nach Überführung der RNA in ein neues Eppendorfröhrchen werden 0,5 ml Isopropanol (2-Propanol) zur RNA-Ausfällung dazugegeben. Das Gemisch inkubiert für 10 min bei Raumtemperatur und wird bei 12000 U/pm und 4°C für 30 min zentrifugiert.
- Nach Absetzen der RNA als weißes Pellet am Boden wird der Überstand verworfen. Am Rand des Eppendorfröhrchens werden

vorsichtig 0,5 ml 70% Ethanol (7 ml Ethanol absolut + 3 ml Nuclease-freies Wasser) eingeträufelt. Dieses Gemisch wird dann für 3 min bei 12000 U/pm und 4°C zentrifugiert.

- Der Überschuß wird abpipettiert, und das auf dem Pellet Verbleibende verdunstet unter dem Abzug (Dauer ca. 30 min).
- Auf das getrocknete Pellet wird 50 µl TE-Puffer (1:10) und 0,25 µl RNase Inhibitor (40U) gegeben. Durch Auf- und Absaugen mit der Pipette (Eppendorf AG, Hamburg, D) wird das Pellet zerkleinert.
- Um den RNA-Gehalt der Proben zu messen, werden diese auf 1:35 verdünnt (2 µl RNA + 68 µl Nuklease-freies Wasser) und anschließend im UV- Photometer bei 260 nm und 280 nm gemessen.
- Die Aufbewahrung der Proben erfolgt bei -20°C.

2.4.2. Reverse Transkriptions - Polymerase Kettenreaktion (RT- PCR)

2.4.2.1. Reverse Transkription

Um bestimmte RNA-Abschnitte gezielt zu vervielfältigen, verwendet man das Verfahren der qualitativen PCR.

Da im ersten Versuch RNA gewonnen wurde und diese von der Taq-Polymerase nicht als Vorlage verwendet werden kann, muss zunächst durch die Methode der Reversen Transkription eine Kopie des RNA-Stranges gebildet werden. Man erhält dadurch einen komplementären DNA-Strang – die sog. cDNA, welche im Anschluss in der PCR eingesetzt werden kann (Qiagen, 2004). Die Umschreibung in cDNA erfolgt mit einem kommerziell erhältlichen Kit (Omniscript® Reverse Transcription, Qiagen, Hilden, D).

Chemikalien

Präparat	Name	Hersteller
Aqua bidest		
Reverse Transkriptions Kit	Omniscript® Reverse Transcription	Qiagen (Hilden, D)
enthält	10× Buffer RT	
	dNTP Mix 5mM	
	RNase free water	
	Omniscript Reverse Transcriptase (4 U/20 µl)	
	Oligo-dT Primer (10 µM)	
	RNasin plus/RNase Inhibitor (40 U/µl)	

Geräte

Gerät	Name	Hersteller
Cycler I	DNA Engine (Gradient Cycler), PTC-200, Peltier-Thermal Cycler	MJ Research Inc. (San Francisco, USA)
Cycler II	PTC 100, Programmable Thermal Controller, Peltier-Effect Cycling,	MJ Research Inc. (San Francisco, USA)
Vortexer	Lab-Dancer	IKA-Werke GmbH & CO KG (Staufen, D)
Zentrifuge	Biofuge fresco	Heraeus (Hanau, D)

Durchführung

Nach Messung des RNA-Gehalts der Proben mit dem UV-Photometer, wird das benötigte Volumen von destilliertem Wasser (Aqua bidest), um eine RNA-Konzentration von 1 µg/µl zu erhalten, wie folgt berechnet:

$\text{RNA-Gehalt der Probe (}\mu\text{l)} = \frac{1}{\text{RNA-Gehalt (}\mu\text{g}/\mu\text{l)}}$	
Zielvolumen (µl)	= 8µl Mix+ RNA (µl) + Aqua bidest (µl)
V _{aqua bidest} (µl)	= 20 µl - 8 µl Mix - RNA (µl)

Die Zusammensetzung des Omniscript®-Mastermixes lautet:

1× Mastermix (Omniscript®): 2 µl 10× BufferRT
2 µl dNTP Mix (5 mM)
2 µl Oligo-dT Primer
1 µl RNAsin plus/RNase Inhibitor (40U/µl)
1 µl Omniscript Reverse Transcriptase (4U/20 µl)

Für jede Probe wird ein Cup (PCR Softstrips, 0,2ml, Biozym, D) vorbereitet, in welches 8 µl Mastermix und die berechnete Menge von Aqua bidest und RNA pipetiert werden. Dann folgt die Inkubation im Cycler bei 37° C für eine Stunde.

2.4.2.2. Qualitative PCR

Mithilfe dieser Methode können beliebig viele Kopien einer bestimmten DNA-Sequenz erstellt werden. Es braucht dafür zwei Oligonukleotide (Primer), eine hitzebeständige DNA-Polymerase und vier Desoxynucleosid-Triphosphate (Desoxyadenosin-Triphosphat (dATP), Desoxythymidin-Triphosphat (dTTP), Desoxycytidin-Triphosphat (dCTP), Desoxyguanosin-Triphosphat (dGTP)).

Die PCR verläuft in drei Schritten:

Im ersten Schritt wird die cDNA durch Hitze in zwei Einzelstränge, den kodierenden und den komplementären Strang, denaturiert. Im zweiten Schritt, dem Anealing (Anlagerung), binden die gewählten Primer an die komplementäre Zielsequenz der cDNA. Der erste Primer bindet an die komplementäre Sequenz am 3'-Ende, während der zweite Primer sich am 5'-Ende des kodierenden Strangs anlagert und somit beide 3'-Enden der Primer aufeinander zeigen. Im dritten Schritt, der Amplifikation, werden vom 3'-Ende der Primer die markierten Abschnitte durch die Taq-Polymerase wieder zu Doppelsträngen zusammengefügt. Mit Beginn des nächsten Zyklus wiederholen sich diese drei Schritte, so dass nach mehreren Zyklen die Anzahl der Kopien exponentiell ansteigt, d.h. 35 PCR-Zyklen ergeben dann 2^{35} Kopien (Qiagen, 2004).

Chemikalien

Präparat	Name	Hersteller
Qualitative-PCR-Kit	PAN-System®	Qiagen (Hilden, D)
enthält	Aqua bidest	
	dNTP Mix 5mM	
	MgCl ₂ (Magnesium-Chlorid) 50 mM	
	PCR Buffer 10x (+ 15 mM MgCl ₂)	
	Taq-Polymerase 5 U/µl	
Primer A/B	5'/3' HR GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase)	MWG Biotech AG (Ebersberg, D)
	[5' TCA TCA GCA ATG CCT CCT GC- 3']	
	[5' GCT CAG GGA TGA CCT TGC C- 3']	

Geräte

Gerät	Name	Hersteller
Cycler I	DNA Engine (Gradient Cycler), PTC-200, Peltier-Thermal Cycler	MJ Research Inc. (San Francisco, USA)
Cycler II	PTC 100, Programmable Thermal Controller, Peltier-Effect Cycling,	MJ Research Inc. (San Francisco, USA)
Vortexer	Lab-Dancer	IKA-Werke GmbH & CO KG (Staufen, D)
Zentrifuge	Biofuge fresco	Heraeus (Hanau, D)

Durchführung

Von jeder Probe werden 2 µl cDNA in ein vorbereitetes Cup (PCR Softstrips, 0,2 ml, Biozym, Hamburg, D) gegeben. Es folgt die Herstellung des Supermix aus dem PAN-System®.

1× Supermix (PAN®-System):	48	µl	Aqua bidest
	5	µl	10× PCR-Buffer
	1	µl	dNTP Mix
	1	µl	5' HR GAPDH (Primer A)
	1	µl	3' HR GAPDH (Primer B)
	2	µl	MgCl ₂
	0,25	µl	Taq-Polymerase

Pro Probe werden 48 µl Supermix eingesetzt und vorsichtig vermischt. Neben diesen Proben wird ein Cup nur mit Supermix und ohne cDNA bereitet, welche als Negativ-Kontrolle dient. Die Programmierung des Cyclers für die PCR erfolgt nach untenstehendem Schema:

1	4:00 min 94°C	Initiale Denaturierung
2	0:45 min 94°C	Denaturierung
3	0:45 min 55°C	Annealing (AT variabel)
4	1:30 min 72°C	Extension
5	go to line 2 for 34 times	
6	0:45 min 94°C	
7	0:45 min 55°C	Annealing (AT variabel)
8	5:00 min 72°C forever 8°	Final Extension

Nach Beendigung der PCR werden die Proben bei - 20°C aufbewahrt.

2.4.2.3. Gelelektrophorese

Durch die Gelelektrophorese werden die Amplifikate aufgrund ihrer negativen Ladung der Größe nach aufgetrennt. Durch die Maschenstruktur des Gels wandern kleinere DNA-Fragmente schneller zur Kathode als grössere. Diese Geschwindigkeitsunterschiede können im Anschluss unter UV-Licht dokumentiert und bewertet werden. Ziel ist es, die Qualität der Amplifikate und somit den Erfolg der PCR zu beurteilen. Als Vergleich dient neben einer Standardprobe der Einsatz der Negativ-Kontrolle aus der PCR.

Chemikalien

Präparat	Name	Hersteller
Agarose	Agarose Electrophoresis Grade	Invitrogen life technologies (Karlsruhe, D)
Aqua bidest		
DNA-Ladder	100bp DNA-Ladder (50 lanes)	Promega (Mannheim, D)
Gel Red™		Biotium Inc. Hayward (California, USA)
Loading Dye	Blue/orange 6× Loading Dye	Promega (Mannheim, D)
TBE-Puffer (1x)	118,65 g TRI-Sodium-Citrate-2-hydrate	Riedel-de Haën (Seelze, D)
	77,04 g Borsäure, H ₃ BO ₃	Fisher Scientific GmbH (Schwerte, D)
	5,58 g EDTA pH 8	Carl Roth GmbH+CO.KG (Karlsruhe, D)
	3 l Aqua bidest	
	→ 1× TBE-Puffer: 5× TBE-Puffer + Aqua bidest (Verhältnis 4:1)	

Geräte

Gerät	Name	Hersteller
Gelkammer	Owl-Separations Systems, Standard PowerPac B25	Thermo Fisher Scientific (Portsmouth, NH, USA)
Kamera	G2-digital camera	Canon (Krefeld, D)
Mikrowelle	Express-Cook & Defrost	Sharp (Hamburg, D)
UV-Kammer	UVT-20	Herolab GmbH (Wiesloch, D)
Waage	Type 1475	Sartorius (Göttingen, D)

Durchführung

Die Herstellung des Gels erfolgt aus 2 g Agarose und 100 ml 1× TBE-Puffer. Die Mischung wird in der Mikrowelle mehrmals aufgeköcht, bis sie klar wird. Das Gel wird unter dem Abzug in Form gegossen und mit 1 µl Gel Red® versetzt. Im Anschluss wird es in die Elektrophoresekammer gelegt und gefilterter 1× TBE-Puffer hinzugefügt, der als Laufpuffer fungiert.

Die Produkte der PCR werden unterdessen auf Eis aufgetaut. Die Proben für die Gelelektrophorese setzten nach folgendem Schema zusammen:

	Negativ-Kontrolle	Standard	Probe
Aqua bidest	-	7µl	-
DNA-Ladder	-	7µl	-
Loading Dye	2,3µl	7µl	2,3 µl
PCR-Produkt	8 µl	-	8 µl

In der Gelelektrophorese werden 4,8 µl der jeweiligen Probe eingesetzt. Bei einer Spannung von 90V dauert jeder Lauf ca. 90 min. Die Auswertung erfolgt mithilfe einer digitalen Kamera und den Auswertungsprogrammen „Bio Doc Analyse“ und „Adobe Photoshop“ (Abbildung 10).

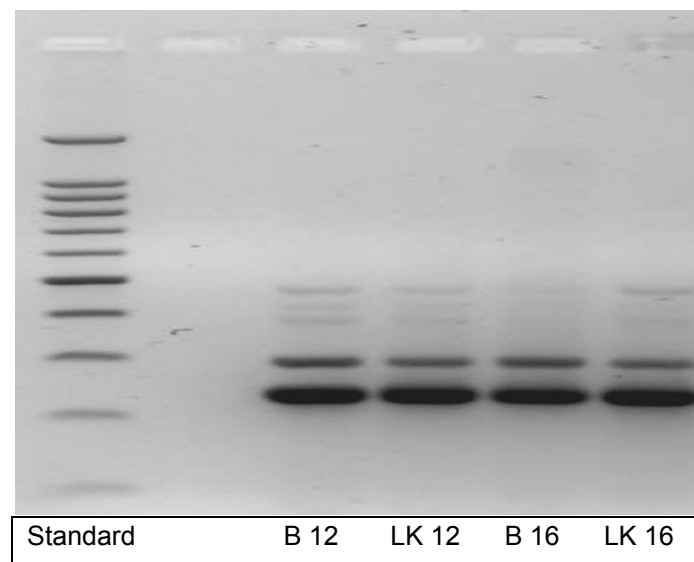


Abbildung 10: Gelelektrophorese der verwendeten Proben.
Beispielhaft ist je eine Probe aus Blase (B)
und Lymphknoten (LK) von zwei Tieren
dargestellt (eigenes Bildmaterial)

2.4.3. Real-Time PCR

Um einen Eindruck über die Abläufe während der PCR zu gewinnen, verwendet man das Prinzip der Real-Time PCR. Diese Methode beruht auf dem Prinzip der klassischen Polymerasekettenreaktion, ermöglicht aber während eines jeden Zyklus eine Quantifizierung der Produkte durch die Messung von Fluoreszenzsignalen.

Während der Amplifikation lagern sich nukleinsäurebindende Fluoreszenzfarbstoffe (z.Bsp.: SYBR-Green) an die doppelsträngige DNA an. Diese Bindung absorbiert blaues Licht ($\lambda = 498 \text{ nm}$) und emittiert grünes Licht ($\lambda = 522 \text{ nm}$), welches als Fluoreszenzsignal gemessen wird. Zwar ist die Spezifität dieser Methode gering, da zwischen spezifischen und unspezifischen PCR-Produkten nicht unterschieden werden kann, jedoch gelingt diese Spezifizierung durch die anschließende Schmelzkurvenanalyse. Dabei wird die DNA durch kontinuierliche Temperaturerhöhung aufgespalten. Erreicht dieser Prozess eine bestimmte Schmelztemperatur, entsteht aus dem Doppelstrang wieder ein einzelsträngiges Molekül, wobei der Fluoreszenzfarbstoff freigesetzt und die daraus resultierende Fluoreszenzabnahme registriert wird. Da die doppelsträngige DNA spezifischer PCR-Produkte einen höheren Schmelzpunkt hat als unspezifisch entstehende Primerdimere, ist dadurch eine Unterscheidung möglich.

Mit der Methode der Real-Time-PCR soll quantitativ die Expression von bestimmten Genen ermittelt werden. Um Fehlerquellen vorzubeugen, die aus Gewebe und Untersuchungsmethode resultieren, werden sog. Housekeeping-Gene (HKG) eingesetzt. Dabei handelt es sich um stabile und homogene Gene, die ubiquitär exprimiert sind. Diese Referenzgene werden mit den Zielgenen in Bezug gesetzt (Vgl. 2.4.4.2). Dadurch wird eine Art „Normierung“ erzeugt und Fehlern vorgebeugt, die HKG und Zielgen gleichermaßen betreffen (Qiagen, 2004; Bio-Rad-Laboratories, 2005). Die Abbildungen 10 und 11 zeigen beispielhaft zwei Real-Time-PCR-Messungen an Harnblasen- und Lymphknotengewebe.

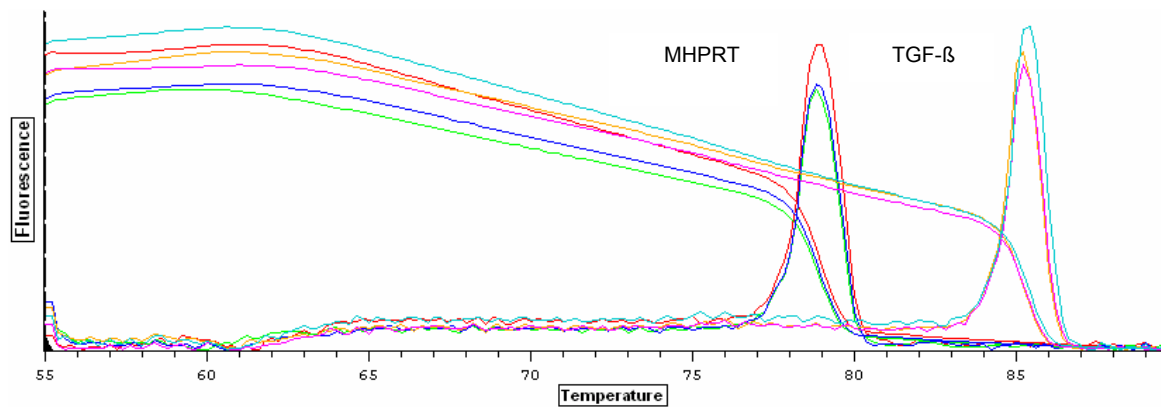


Abbildung 10 : Schmelzkurve der Real-Time-PCR.

Gezeigt ist die Expression von MHPRT und TGF- β im Harnblasengewebe
(eigenes Bildmaterial)

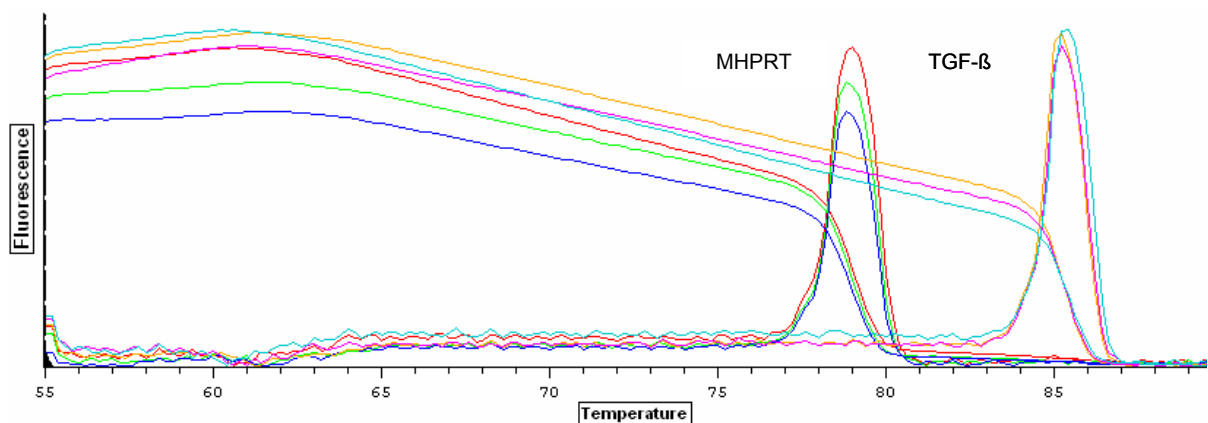


Abbildung 11: Schmelzkurve der RT-PCR. Gezeigt ist die Expression von MHPRT und
TGF- β im Lymphknotengewebe (eigenes Bildmaterial)

Neben den Messungen des HKG und der Zielgene, wird eine „no template control“ (NTC) angelegt, welche alle Reagenzien, außer cDNA, enthält. Dadurch kann eine mögliche Kontamination der Proben ausgeschlossen werden. Ausserdem werden für jeden Primer Standardkurven in verschiedenen Konzentrationsbereichen und ein sog. „Blank“ (SYBR-Green-Mix ohne c-DNA) zur Validierung erstellt. Jedes Gen wird dreifachbestimmt, so dass sich für

jedes Tier insgesamt 48 Messwerte ergeben (Tabelle 11). Die Protokolle entsprechen den Vorgaben der Firmen MWG-Biotech und Qiagen.

Tier X	Blase				Lymphknoten				
	HKG	A	Zielgen	A	HKG	A	Zielgen	A	
	MHPRT 0,1	3	TNF-a IFN-g	3 3	MHPRT 0,1	3	TNF-a IFN-g	3 3	
			IL-4	3			IL-4	3	
			IL-10	3			IL-10	3	
			IL-12b	3			IL-12b	3	
	MHPRT 0,01	3	TGF-β	3	MHPRT 0,01	3	TGF-β	3	
Summe		6		18		6		18	48

Tabelle 11: Anzahl der gemessenen Proben für jedes einzelne Tier (A= Anzahl der Proben)

Chemikalien

Präparat	Name	Hersteller
Aqua bidest		
Primer		
MHPRT (HKG)	Mouse-Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase [5'GGG GCT GTA CTG CTT AAC CAG '3]	MWG-Biotech AG (Ebersberg, D)
TGF-β	TGF-β F [5'-TGA CGT CAC TGG AGT TGT ACG G-3'] TGF-β R [5'- GGT TCA TGT CAT GGA TGG TGC -3']	MWG-Biotech AG (Ebersberg, D)
TNF-α	Mm_Tnf_1_SG QuantiTect Primer Assay (200),(QT00104006)	Qiagen (Hilden, D)
IFN-γ	Mm_Igng_1_SG QuantiTect Primer Assay (200),(QT01038821)	Qiagen (Hilden, D)
IL-4	Mm_Il4_1_SG QuantiTect Primer Assay (200),(QT00160678)	Qiagen (Hilden, D)
IL-10	Mm_Il10_1_SG QuantiTect Primer Assay (200),(QT00106169)	Qiagen (Hilden, D)
IL-12b	Mm_Il12b_1_SG QuantiTect Primer Assay (200),(QT00153643)	Qiagen (Hilden, D)
SYBR-Green	Q™ SYBR-Green Supermix	Biorad (München, D)

Geräte

Gerät	Name	Hersteller
RT-Maschine	MJ-Mini™ (Personal Thermal Cycler), Mini Opticon™ Real Time PCR System	Biorad (München, D)
Vortexer	Lab-Dancer	IKA-Werke GmbH & CO KG (Staufen, D)
Zentrifuge	Biofuge fresco	Heraeus (Hanau, D)
Zentrifuge	Minifuge T	Heraeus Sepatec (Berlin, D)

Durchführung

Die cDNA wird auf 1:10 (2 µl cDNA + 18 µl Aqua bidest) verdünnt. Der Mix aus SYBR-Green™, Primer und Aqua bidest setzt sich, je nach Primercharakter, wie folgt zusammen:

Einfacher Ansatz	BIOTECH-PRIMER	QIAGEN-PRIMER
SYBR-Green-Mix	12,5 µl	12,5 µl
PRIMER A	0,25 µl	2,5 µl
PRIMER B	0,25 µl	-
AQUA BIDESE	11,0 µl	9,0 µl

Im nächsten Schritt erfolgt die Pipettierung des Mixes in Low Tube Strips (Bio-Rad, München, D) unter Zugabe von 1 µl der 1:10 verdünnten Probe.

Die Cups werden mit Flat Cap Strips (Bio-Rad, München, D) verschlossen und für eine Minute bei 800 U/pm zentrifugiert. Die Programmierung der Mini Opticon™ erfolgt nach dem Schema:

1	Incubate 95°C- 00:10:00	Initiale Denaturierung
2	Incubate 95°C - 00:00:15	Denaturierung
3	Incubate 60°C - 00:00:30	Annealing (AT variabel)
4	Incubate 72°C - 00:01:00	Extension
5	Plate read	
6	Goto line to for 45 more times	
7	Melting Curve 55°C-90°C, read every 0,2°C, hold 00:00:02	
8	Incubate at 15°C forever	

2.4.4. Auswertung

2.4.4.1. Klinische Daten

Während der Tierversuche wird das Gewicht, der Zeitpunkt, an dem zum ersten Mal eine Hämaturie auftrat, sowie das Überleben der Tiere in den einzelnen Gruppen erfasst und gruppenspezifisch (control, early-onset, late-onset) ausgewertet.

2.4.4.2. Ergebnisse der Real-Time PCR

Die Ergebnisse der Real-Time-PCR beziehen sich auf die genannten drei Versuchsgruppen, ausserdem wird in den Gruppen zwischen den Gewebetypen Blase und Lymphknoten unterschieden.

Die weitere Auswertung der Messwerte erfolgt mit dem Gerät MJ-Mini™ mit zugehöriger Software der Firma Biorad (München, D) und Microsoft Excel® an einem HP Compaq nx6110 Notebook. Für die Auswertung entscheidende Aspekte der Real-Time-PCR werden im folgenden Abschnitt erläutert.

Um eine unbekannte Templatmenge einer Probe mithilfe der Real-Time-PCR bestimmen zu können ist u.a. entscheidend, nach wie vielen PCR-Zyklen der sogenannte C(t)-Wert (bzw. threshold-cycle = Schwellenwert-Zyklus) erreicht wird. Dieser Wert entspricht der Anzahl an PCR- Zyklen, die nötig sind, um ein konstant definiertes Fluoreszenzniveau zu erreichen. Am C(t)-Wert befindet sich in allen Reaktionsgefäßen die gleiche Menge an neu synthetisierter RNA. Im Falle einer 100% Effizienz der PCR verdoppelt sich mit jedem Zyklus das RNA-Produkt und analog dazu das Fluoreszenzsignal. Dies erlaubt dann Rückschlüsse auf die initial eingesetzte Templatmenge.

Da die Fluoreszenzintensität der Probe die Menge des enthaltenen Materials widerspiegelt, erreichen Proben mit hohem Anteil den definierten PCR-Zyklus (C(t)-Wert) schneller als Proben mit weniger Material (BioRad, 2005).

Mathematisch gesehen ergibt sich daraus folgender Zusammenhang: Es besteht ein indirekter Zusammenhang zwischen dem C(t)-Wert und dem Logarithmus der ursprünglichen Templatmenge in der Probe. Im Idealfall

verdoppelt sich also das PCR-Produkt während jedes einzelnen Zyklus und es handelt sich um eine exponentielle Zunahme (Pfaffl¹, 2004). Wir werten die Ergebnisse der Real-Time-PCR mit der sog. $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode (Livak-Methode) aus. Mit dieser Form der relativen Quantifizierung erfolgt die Auswertung durch den Vergleich der C(t)-Werte von Referenz- und Zielgenen.

Wie erwähnt spielt auch die Effizienz bei der Auswertung eine Rolle. Daher werden zu Beginn der Versuchsreihen Standardkurvenmessungen durchgeführt, um die Amplifikationseffizienz zu ermitteln. Sind die Effizienzen in den weiteren Versuchen ähnlich oder vergleichbar, sind keine weiteren Standardkurven erforderlich und das Maß der Genexpression kann über den C(t)-Wert ermittelt werden (Pfaffl², 2004).

Daraus resultieren folgende Berechnungen:

Wie in Tabelle 11 gezeigt, lassen für jedes einzelne Tier 48 Messwerte für die einzelnen Gewebe und Gene bestimmen. Ein Messwert setzt sich aus Effizienz- und C(t)-Wert zusammen. Da jedes Gen dreifach bestimmt wird, werden die zwei Messungen mit der höchsten Effizienz eingeschlossen. Aus diesen beiden Messungen wird der Mittelwert (MW) von Effizienz und C(t)-Wert gebildet. Es ergeben sich dann aus den ursprünglich 48 Messwerten, 32 Messwerte für jedes einzelne Tier.

Im nächsten Schritt werden aus allen Effizienz- und C(t)-Werten der jeweiligen Gruppe (control, early-onset, late-onset) die entsprechenden Mittelwerte gebildet. Diese Mittelwerte bilden die Grundlage für die weiteren Berechnungen. (Vgl. Tabelle 15, 16)

Im nächsten Schritt wird das Zielgen zum Referenzgen (MHPRT) in Beziehung gesetzt. Aus dieser Rechnung ergibt sich der sog. $\Delta C(t)$ -Wert.

$$\Delta C(t) = C(t)_{\text{Zielgen}} - C(t)_{\text{HKG}}$$

Diese Subtraktion erfolgt in allen drei Versuchsgruppen.

$$\begin{aligned}\Delta C(t)_{\text{control}} &= C(t)_{\text{Zielgen}} - C(t)_{\text{MHPRT}} \\ \Delta C(t)_{\text{early-onset}} &= C(t)_{\text{Zielgen}} - C(t)_{\text{MHPRT}} \\ \Delta C(t)_{\text{late-onset}} &= C(t)_{\text{Zielgen}} - C(t)_{\text{MHPRT}}\end{aligned}$$

Im nächsten Schritt wird der $\Delta\Delta\text{-C}(t)$ -Wert errechnet. Dabei wird der $\Delta C(t)$ -Wert der Behandlungsgruppe (early-onset/late-onset) vom $\Delta C(t)$ -Wert der Kontrollgruppe (control) subtrahiert. Da auch die Gruppen mit unterschiedlichem Behandlungszeitpunkt (early-onset, late-onset) verglichen werden sollen, ergibt sich folgende Gleichung:

$$\begin{aligned}\Delta\Delta\text{-C}(t) &= \Delta C(t)_{\text{Behandlungsgruppe}} - \Delta C(t)_{\text{Kontrollgruppe}} \\ \Delta\Delta\text{-C}(t) &= \Delta C(t)_{\text{early-onset}} - \Delta C(t)_{\text{late-onset}}\end{aligned}$$

Aufgrund der vergleichbaren Effizienzwerte von MHPRT und der Zielgenen, kann das Expressionslevel der Zielgene wie folgt ermittelt werden:

$$\text{Expression}_{\text{Zielgen}} = 2^{-\Delta\Delta\text{-C}(t)}$$

Das Ergebnis dieser Berechnung gibt das Maß der höheren bzw. niedrigeren Expression des Zielgens im Vergleich zum HKG zwischen den verglichenen Gruppen wieder. Da es sich um eine expotentielle Gleichung handelt, bedeutet eine Expression = 1, dass Zielgen und HKG in gleicher Menge exprimiert werden. Werte < 1 zeigen eine verminderte Expression des Zielgens gegenüber dem Referenzgen an, während Werte > 1 erhöhte Expression zugunsten des Zielgens anzeigen (¹Pfaffl, 2004; ²Pfaffl, 2004).

3 Ergebnisse

Um die Ergebnisse der vorbeschriebenen Versuche darzustellen, erfolgt die Unterteilung nach:

1. Analyse der klinischen Daten der Tierversuche
2. Analyse der Ergebnisse der Real-Time-PCR

Bei der Auswertung der Messwerte spielen allein die 3 Versuchsgruppen, nicht das einzelne Tier, eine Rolle, da sich die Ergebnisanalyse auf die Unterschiede zwischen den Gruppen (hinsichtlich Therapie, Behandlungszeitpunkt) bezieht.

3.1 Allgemeine Beobachtungen

Die Durchführung der Tierversuche verläuft komplikationslos. Die Mäuse können ohne Probleme anästhesiert und katheterisiert werden. Die Instillation der MB-49 Zellen, sowie das Einbringen von CpG-ODN (1668) in die Blase über einen transurethralen Katheter gelingt bei allen Tieren.

Am Ende der Versuchsreihe ist die Mehrzahl der Tiere geschwächt und es werden höhere Dosen an Anästhetika benötigt, um die Tiere zu narkotisieren.

Nach Opferung der Tiere läßt sich bei allen Tieren ein palpabler Tumor feststellen.

3.2 Klinische Daten der Tierversuche

Die Aufteilung der Tiere erfolgt zufällig in 3 verschiedene Gruppen.

Gruppe I dient als Kontrollgruppe („control-group“), während Gruppe II und III sich im Behandlungsbeginn (früh („early-onset-group“) und spät („late-onset-group“) einsetzende Behandlung) unterscheiden. Tabelle 10 stellt das Behandlungsschema der Tierversuche dar.

3.2.1 Gruppenstärke

In Tabelle 12 ist die Verteilung der Tiere in den einzelnen Gruppen gezeigt, zusätzlich ist die Anzahl der verstorbenen Tiere angegeben.

Während der ersten drei Versuchstage versterben zwei Tiere unter der Narkose, weiterhin wird ein Tier tot im Käfig aufgefunden. Zwei dieser Mäuse fallen von Anfang an durch einen reduzierten Allgemeinzustand auf.

Die meisten Tiere (2) sterben in der „early-onset-group“, in der Rangliste folgt die „late-onset-group“ mit einem toten Tier, während in der „control-group“ kein Tier verstirbt. Am Ende der Versuchsreihen schließen wir insgesamt 33 Tiere ein. Diesen werden am 13. Versuchstag Blasen- und Lymphknotengewebe entnommen. Bei einem Tier der „early-onset-group“ kann kein Lymphknotengewebe entnommen werden, da der Situs so stark von Metastasen durchsetzt ist, dass eine Differenzierung der Gewebe nicht mehr möglich ist.

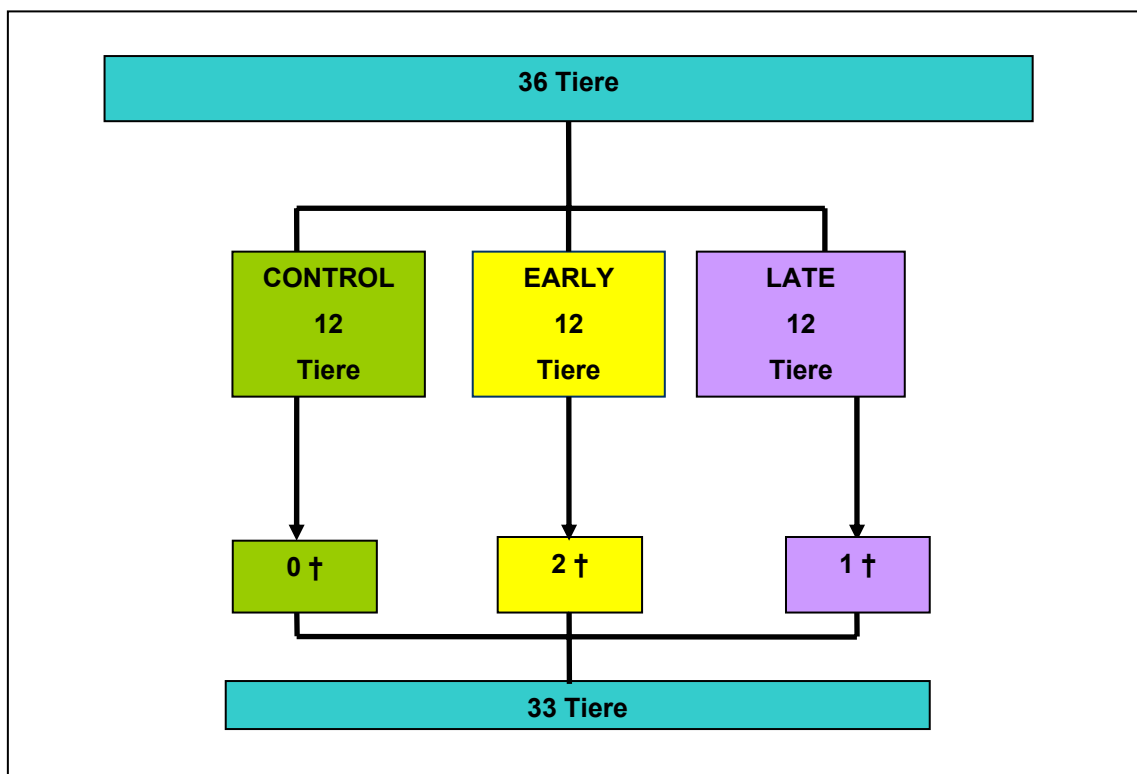


Tabelle 12: Anzahl der Tiere in den einzelnen Gruppen inklusive der verstorbenen Tiere (= †)

3.2.2 Gewichtsverlauf

Bei jeder Visite wird das Gewicht der Tiere erfasst. In den nachfolgenden Abbildungen (Tabelle 13, Abbildung 11) sind die Gewichtsverläufe der einzelnen Gruppen dargestellt. Die Körpergewichte sind als Mittelwerte aus den Gewichten aller Tiere der Gruppe angegeben. Zur Verdeutlichung ist gleichzeitig der Gewichtsverlust vom ursprünglichen Körpergewicht (in %) angegeben.

Anhand der aufgezeigten Daten lässt sich ein Gewichtsverlust in allen 3 Gruppen verzeichnen. Zu beachten ist, dass die Ausgangsgewichte in den Gruppen um 1-2 g variieren, das Gewicht an Tag 12 also nicht zum absoluten Vergleich der Gruppen untereinander geeignet ist.

Betrachtet man aber den prozentualen Anteil des Gewichtsverlusts (Tabelle 13), so zeigt die „early-onset-group“ den stärksten Gewichtsverlust (15,58%), es folgt die Kontrollgruppe (14,56%) gefolgt von der „late-onset-group“ mit 12,63% Gewichtsverlust, jeweils ausgehend vom Körpergewicht an Tag 0.

Gruppe	Tiere insgesamt	Gewicht Tag 0	Gewicht Tag 5	Gewicht Tag 12	Gewichtsverlust (%)
CONTROL	12	27,81	26,93	23,76	14,56
EARLY	10	26,5	24,64	22,37	15,58
LATE	11	25,26	24,12	22,07	12,63
SUMME	33	25,52	25,23	22,73	10,93

Tabelle 13: Durchschnittliches Körpergewicht und Gewichtsverlust (%) der Mäuse in den einzelnen Gruppen

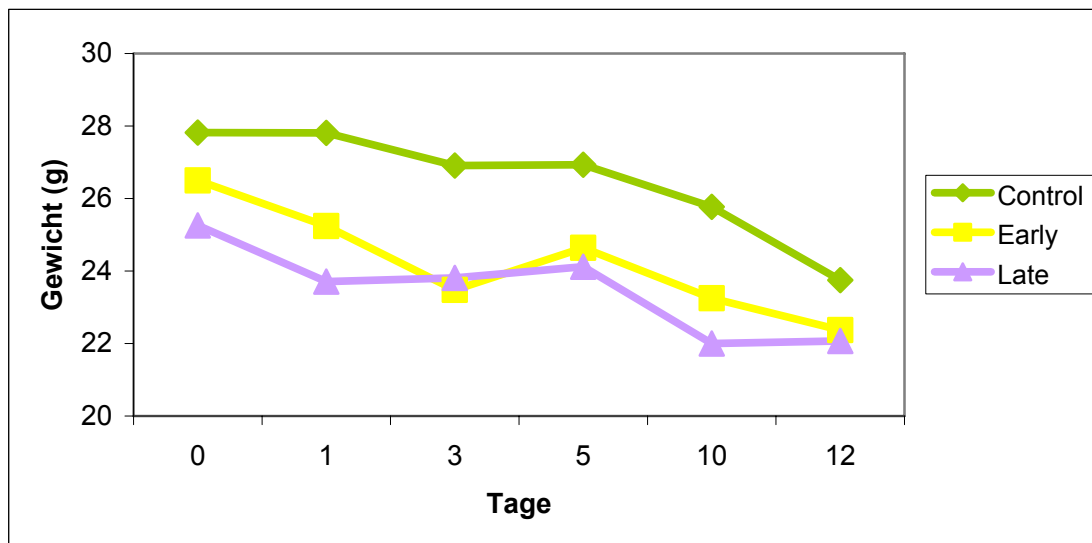


Abbildung 11: Gewichtsverlauf in allen 3 Gruppen während des gesamten Versuchszeitraums (Tag 0-12)

3.2.3 Hämaturie

Als dritten Parameter erfassen wir die Makrohämaturie: Bestimmt wird ob diese auftritt und wenn ja, zu welchem Zeitpunkt.

In den graphischen Darstellungen ist erkennbar, dass die Tiere mit „late-onset“ Behandlungsschema am häufigsten (100%) unter einer Hämaturie leiden. In dieser Rangliste folgt mit 92 % die „control-group“ und mit 80% die „early-onset-group“ (Tabelle 14).

Betrachtet man nun den Zeitpunkt an dem die Makrohämaturie das erste Mal auftritt, so wird diese Tabelle von der „control-group“ mit einer Makrohämaturie nach durchschnittlich sieben Tagen angeführt, gefolgt von der „late-onset-group“ nach rund acht Tagen. Die Behandlungsgruppe „early-onset“ dagegen weist eine Hämaturie erst nach rund neun Tagen auf.

GRUPPE	Tiere insgesamt	Tiere mit Hämaturie	in %	durchschnittlicher Hämaturiebeginn (d)
CONTROL	12	11	92	7,27
EARLY	10	8	80	8,75
LATE	11	11	100	7,81

Tabelle 14: Anteil der Tiere mit Hämaturie unter Angabe des Tages an dem diese durchschnittlich begann (d= Tag)

3.3 Ergebnisse der Real-Time-PCR

Grundlage für die Analyse der Messwerte aus der Real-Time-PCR bilden die Mittelwerte (MW) der Einzelwerte aus allen Tieren der jeweiligen Gruppe.

In diesen Mittelwerten sind alle gewählten Rohdaten eingeschlossen, welche in Tabelle 15 und 16 dargestellt werden.

Neben dem Housekeeping-Gen MHPRT sind die einzelnen Zielgene (TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-12b, TGF- β) mit den jeweiligen Messwerten und der dazugehörigen Konzentration angegeben. Über verschiedene Schritte errechnet sich der $2^{-\Delta\Delta-C(t)}$ -Wert, der den Expressionsfaktor des Zielgens in den gegenübergestellten Gruppen repräsentiert.

Um einen besseren Überblick zu erreichen erfolgt die Darstellung der Daten getrennt für Blasen- und Lymphknotengewebe. Die Zielgene sind der jeweiligen Immunantwort (Th₁/Th₂) und der entsprechenden Versuchsgruppe zugeordnet.

– Ergebnisse –

Gruppe	MHPRT Eff (%)	MHPRT C(t)	Konz (ng/μl)	Primer	Konz	Primer Eff (%)	Primer C(t)	Δ c(t)
CONTROL	73,33	24,38	0,1	TNF-a	0,1	74,30%	28,06	3,68
				IFN-g	0,1	66,74	28,31	3,93
				IL-4	0,1	64,99	32,01	7,63
				IL-10	0,1	75,72	31,95	7,57
				IL-12b	0,1	60,7	35,05	10,67
	84,73	24,34	0,01	TGF-β	0,01	79,85	25,6	1,26
EARLY	71,28	23,04	0,1	TNF-a	0,1	81,57	27,57	4,53
				IFN-g	0,1	74,57	29,41	6,37
				IL-4	0,1	66,43	33,32	10,28
				IL-10	0,1	80,6	28,76	5,72
				IL-12b	0,1	75,43	33,9	10,86
	89,57	23,16	0,01	TGF-β	0,01	83,63	23,86	0,7
LATE	79,72	23,21	0,1	TNF-a	0,1	74,61	27,55	4,34
				IFN-g	0,1	78,4	28,22	5,01
				IL-4	0,1	66,99	36,68	13,47
				IL-10	0,1	74,27	31,63	8,42
				IL-12b	0,1	68,37	36,01	12,8
	89,67	25,25	0,01	TGF-β	0,01	80,67	26,5	1,25

Tabelle 15: Rohdaten für Effizienz- und C(t)-Werte der einzelnen Tiergruppen und Gene im Blasengewebe (Eff = Effizienz, Konz = Konzentration)

– Ergebnisse –

Gruppe	MHPRT Eff (%)	MHPRT C(t)	Konz (ng/μl)	Primer	Primer Eff (%)	Primer C(t)	Konz	Δ c(t)
CONTROL	76,12	25,37	0,1	TNF-α	69,08	28,87	0,1	3,5
				IFN-γ	73,43	28,29	0,1	2,92
				IL-4	62,37	31,24	0,1	5,87
				IL-10	71,62	32,3	0,1	6,93
				IL-12b	74,87	31,8	0,1	6,43
	84,28	25,3	0,01	TGF-β	81,24	27,25	0,01	1,95
EARLY	73,96	24,69	0,1	TNF-α	70,23	28,26	0,1	3,57
				IFN-γ	75,65	28,89	0,1	4,2
				IL-4	70,75	32,94	0,1	8,25
				IL-10	74,92	31,31	0,1	6,62
				IL-12b	72,4	33,67	0,1	8,98
	84,42	26,4	0,01	TGF-β	77,28	27,25	0,01	0,85
LATE	77,4	24,29	0,1	TNF-α	75,24	27,18	0,1	2,89
				IFN-γ	76,82	27,63	0,1	3,34
				IL-4	67,17	35,01	0,1	10,72
				IL-10	72,65	33,15	0,1	8,86
				IL-12b	74,02	33,23	0,1	8,94
	83,72	25,77	0,01	TGF-β	84,22	25,54	0,01	-0,23

Tabelle 16: Rohdaten für Effizienz- und C(t)-Werte der einzelnen Tiergruppen und Gene im Lymphknoten (Eff = Effizienz, Konz = Konzentration)

3.3.1 Ergebnisse der Real-Time-PCR im Blasengewebe

3.3.1.1 Berechnung der relativen Expressionen

Die folgenden Tabellen (Tabelle 17-19) geben die errechneten Werte mit der Zuordnung zur jeweiligen Gruppe wieder. Die 3 Gruppen werden durch die Berechnung zueinander in Bezug gesetzt.

Zuordnung	Zielgen	$\Delta\text{-c(t) EARLY}$	$\Delta\text{-c(t) CONTROL}$	$\Delta\Delta\text{-c(t)}$	$2^{-\Delta\Delta\text{-C(t)}}$
Th₁- Zytokine	TNF- α	4,53	3,68	0,85	0,55
	IFN- γ	6,37	3,93	2,44	0,18
	IL-12b	10,86	10,67	0,19	0,88
Th₂- Zytokine	TGF- β	0,7	1,26	-0,56	1,47
	IL-4	10,28	7,63	2,65	0,16
	IL-10	5,72	7,57	-1,85	3,61

Tabelle 17: $\Delta\text{C(t)}$ -, $\Delta\Delta\text{-C(t)}$ - und $2^{-\Delta\Delta\text{-C(t)}}$ – Werte aller Zielgene für die Gruppen „Early-onset“ und „Control“ im Blasengewebe

– Ergebnisse –

Zuordnung	Zielgen	$\Delta\text{-c(t) LATE}$	$\Delta\text{-c(t) CONTROL}$	$\Delta\Delta\text{-c(t)}$	$2^{-\Delta\Delta\text{-C(t)}}$
Th ₁ - Zytokine	TNF- α	4,34	3,68	0,66	0,63
	IFN- γ	5,01	3,93	1,08	0,47
	IL-12b	12,8	10,67	2,13	0,23
Th ₂ - Zytokine	TGF- β	1,25	1,26	-0,01	1,01
	IL-4	13,47	7,63	5,84	0,02
	IL-10	8,42	7,57	0,85	0,55

Tabelle 18: $\Delta\text{C(t)}$ -, $\Delta\Delta\text{-C(t)}$ - und $2^{-\Delta\Delta\text{-C(t)}}$ – Werte aller Zielgene für die Gruppen „Late-onset“ und „Control“ im Blasengewebe

Zuordnung	Zielgen	$\Delta\text{-c(t) LATE}$	$\Delta\text{-c(t) EARLY}$	$\Delta\Delta\text{-c(t)}$	$2^{-\Delta\Delta\text{-C(t)}}$
Th₁- Zytokine	TNF- α	4,34	4,53	-0,19	1,14
	IFN- γ	5,01	6,37	-1,36	2,57
	IL-12b	12,8	10,86	1,94	0,26
Th₂- Zytokine	TGF- β	1,25	0,7	0,55	0,68
	IL-4	13,47	10,28	3,19	0,12
	IL-10	8,42	5,72	2,7	0,16

Tabelle 19: $\Delta\text{C(t)}$ -, $\Delta\Delta\text{-C(t)}$ - und $2^{-\Delta\Delta\text{-C(t)}}$ – Werte aller Zielgene für die Gruppen „Late-onset“ und „Early-onset“ im Blasengewebe

Entscheidend für die weiteren Ergebnisanalyse ist der $2^{-\Delta\Delta\text{-C(t)}}$ –Wert. Er gibt das Maß der Zytokinexpression in der Gruppe der unbehandelten (beziehungsweise der spätbehandelten) Tiere im Vergleich zur Gruppe der behandelten Tiere wieder. Da in der Fragestellung zwischen Zytokinen der Th₁- und Th₂-basierten Immunantwort unterschieden wird, erfolgt auch hier diese Unterteilung.

3.3.1.2 Th₁-Zytokine

3.3.1.2.1 Tumornekrosefaktor- α (TNF- α)

TNF- α gilt als „Akutes-Phase-Protein“ und wird v.a. von den Makrophagen gebildet. Abbildung 12 gibt die relative TNF- α Expression in der Blase wieder. In beiden Behandlungsgruppen ist die TNF- α -Expression im Vergleich mit der Kontrollgruppe reduziert. Eine Mehrexpression dieses Zytokins findet sich lediglich im Vergleich der beiden Behandlungsgruppen. Die „late-onset-group“ exprimiert TNF- α 1,14-fach höher als die „early-onset-group“.

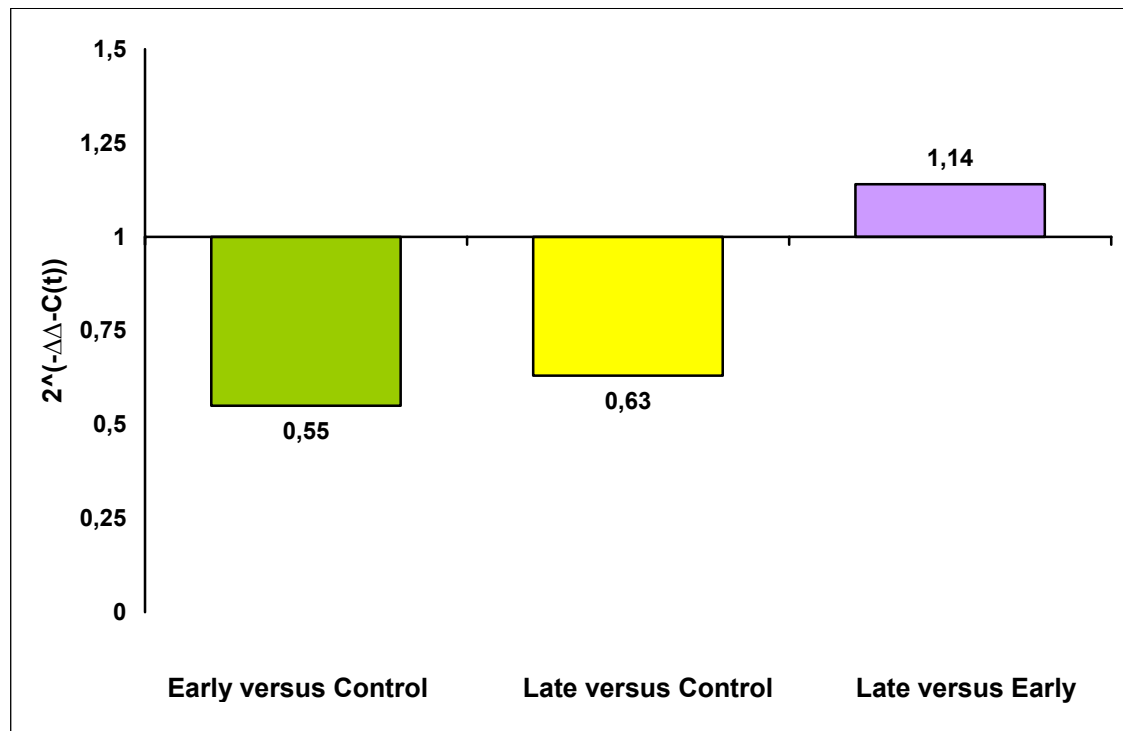


Abbildung 12: Darstellung der TNF- α Expression im Blasengewebe

3.3.1.2.2 Interferon- γ (IFN- γ)

IFN- γ ist ein wichtiger Faktor für die Aktivierung der Makrophagen.

Deutlich verminderte Expressionswerte stellen sich für dieses Zytokin in den beiden Behandlungsgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe dar. Weiterhin exprimiert die frühe Behandlungsgruppe IFN- γ in geringerem Maße als die späte Behandlungsgruppe.

Auch hier zeigt sich, wie bereits bei der Messung von TNF- α , dass sich bei den Behandlungsgruppen keine erhöhte Expression eines Th₁-Zytokin im Vergleich zur Kontrollgruppe nachweisen lässt (Abbildung 13).

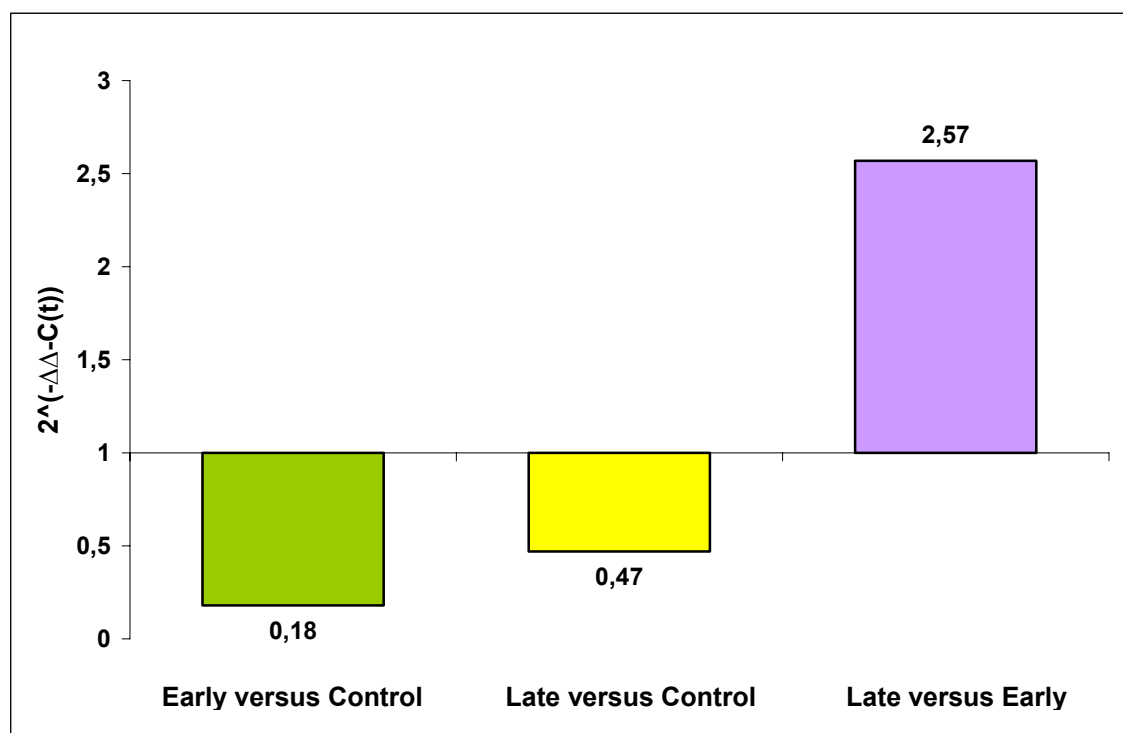


Abbildung 13: Darstellung der IFN- γ -Expression im Blasengewebe anhand des $2^{(-\Delta\Delta-C(t))}$ -Wert

3.3.1.2.3 Interleukin- 12b (IL-12b)

Interleukin 12-b spielt eine Rolle bei der Aktivierung der NK-Zellen, sowie bei der Differenzierung der Th₁-Zellen.

Insgesamt lässt sich hier keine vermehrte IL-12b Expression nachweisen, weder im Vergleich zwischen Behandlungsgruppen und Kontrollgruppe, noch im Vergleich der Behandlungsgruppen zueinander. In der Gegenüberstellung mit der Kontrollgruppe findet sich die kleinste Expression in der „late-onset-group“, während in der „early-onset-group“ die Zytokinausschüttung auf Niveau der Kontrollgruppe liegt (Abbildung 14).

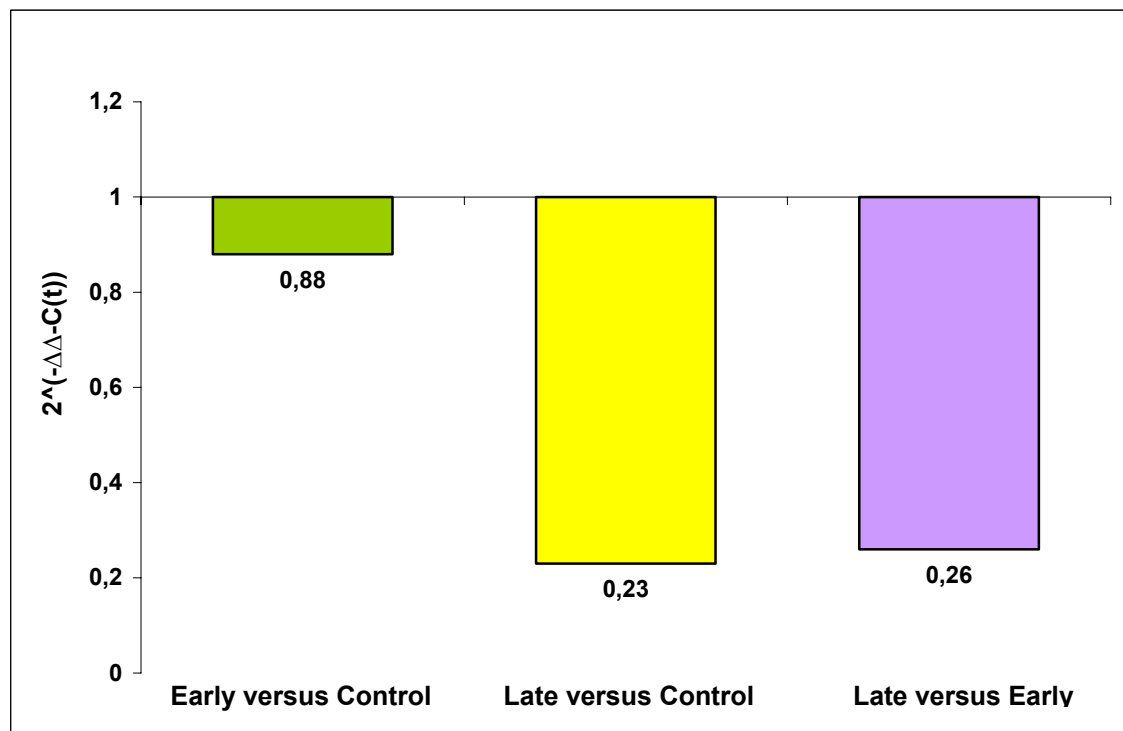


Abbildung 14: Darstellung der Interleukin-12b Expression mithilfe des $2^{-\Delta\Delta C(t)}$ -Wert im Blasengewebe

3.3.1.3 Zusammenfassung Th₁- Zytokine

Der folgende Abschnitt fasst die Ergebnisse der Th₁-Zytokine in den jeweiligen Vergleichsgruppen zusammen. Insgesamt ist ersichtlich, dass sich die Behandlungsgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht durch eine Mehrexpression der Th₁- Zytokine unterscheiden lassen.

Bei TNF- α und IFN- γ ist ein ähnliches Verteilungsmuster zwischen den drei Vergleichsgruppen zu beobachten: Die geringste Expression dieser beiden Zytokine findet sich in der Gegenüberstellung „early versus control“. Die Messwerte für den Vergleich „late versus control“ zeigt zwar höhere Werte für die Expression, allerdings wird die Marke 1 nicht erreicht (Vgl. Abbildung 12, 13).

Ein entgegengesetztes Muster ist in der Interleukin-12b Expression zu erkennen. Hier befindet sich der kleinste Zytokinnachweis in der Vergleichsgruppe „late versus control“, während der Vergleich der späten Behandlungsgruppe mit der Kontrollgruppe eine höhere Expression zeigt, die insgesamt jedoch auch unter 1 liegt (Vgl. Abbildung 14).

3.3.1.4 Th₂- Zytokine

3.3.1.4.1 Transforming-growth-factor β (TGF- β)

TGF- β besitzt antiinflammatorisches Potential und ist an der Aktivierung der Th₂-Zellen beteiligt.

In der Realtime-PCR zeigen sich die höchsten Expressionswerte im Vergleich der Behandlungsgruppen und der Kontrollgruppe. Der höchste Wert lässt sich in der Gegenüberstellung „early versus control“ messen. TGF- β ist im Gewebe der frühbehandelten Tiere knapp 1,5fach höher exprimiert, als in den Geweben der Kontrollgruppe. Die Messung „late versus control“ ergibt den Faktor 1,01, dementsprechend weist diese Behandlungsgruppe eine vergleichbare Zytokinexpression wie die Kontrollgruppe auf. Es folgt daraus, dass der Vergleich zwischen den beiden Behandlungsgruppen eine verminderte TGF- β -Expression in der „late-onset-group“ ergibt (Abbildung 15).

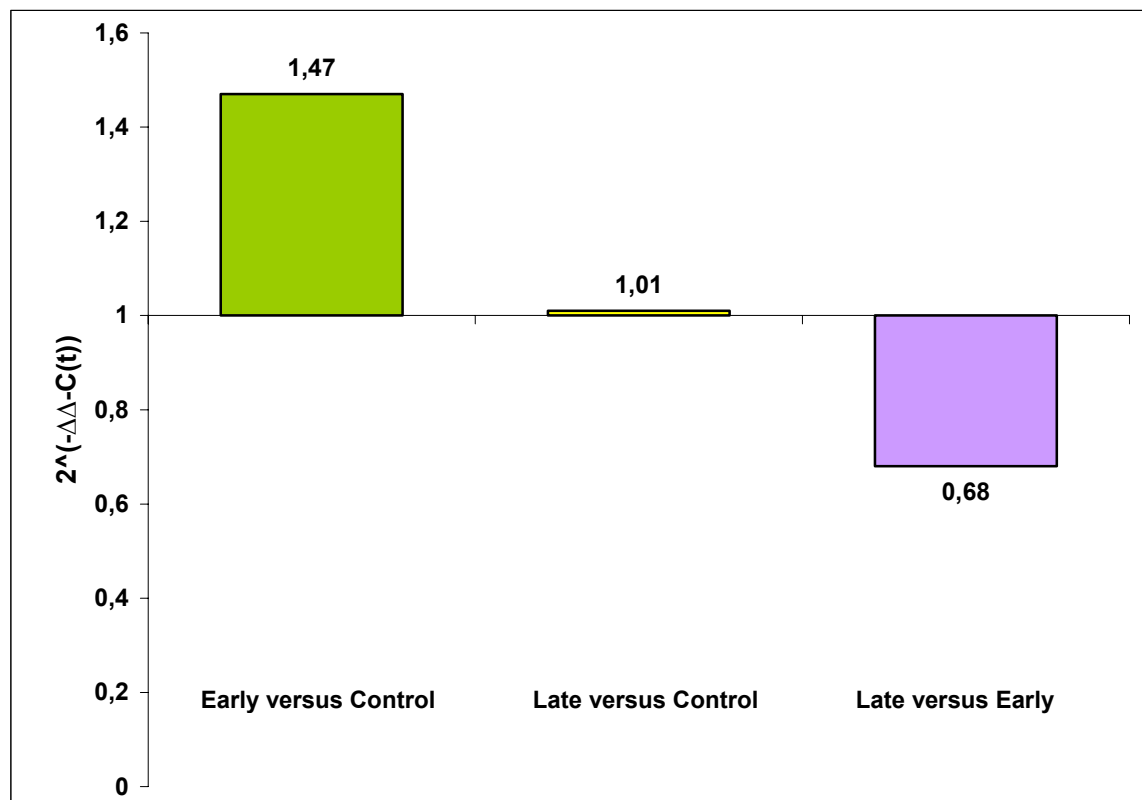


Abbildung 15: Darstellung der TGF- β -Expression in den verschiedenen

Vergleichsgruppen im Blasengewebe

3.3.1.4.2 Interleukin-4 (IL-4)

IL-4 spielt eine wichtige Rolle in der B-Zell-Aktivierung und wirkt inhibitorisch auf die Differenzierung der Th₁-Zellen.

Alle Messungen der IL-4 Expression ergeben nur minimale Werte für dieses Zytokin in den einzelnen Geweben. Die Gegenüberstellung „late versus control“ weist den kleinsten Faktor auf und ist also in diesem Gewebe kaum nachweisbar.

Eine verringerte Expression von IL-4 zeigen auch die Messungen der Vergleichsgruppe „early versus control“, auch hier ist von einer deutlichen Reduktion dieses Zytokins auszugehen (Abbildung 16).

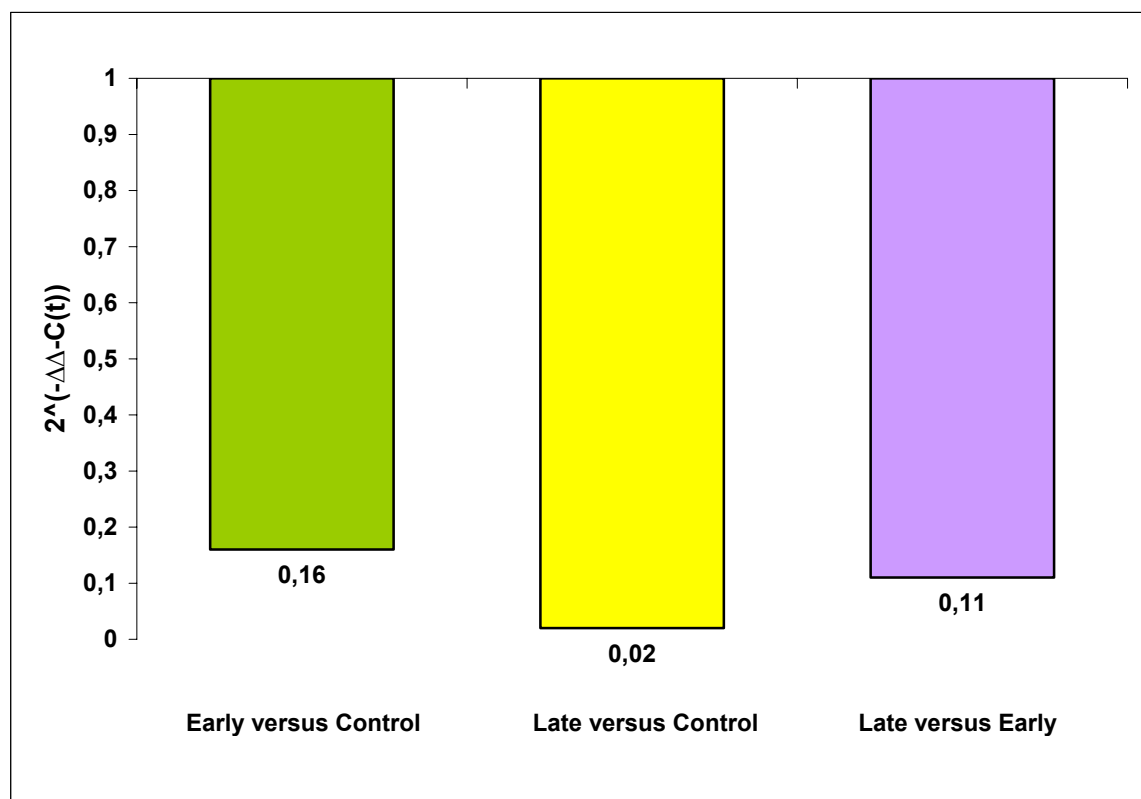


Abbildung 16: Zytokinexpression von IL-4 in den Vergleichsgruppen in der Blase

3.3.1.4.3 Interleukin-10 (IL-10)

Interleukin-10 wirkt inhibitorisch auf die Makrophagen und verhindert so eine überschüssige Entzündungsreaktion.

Den mit Abstand höchsten Messwert verzeichnet die frühe Behandlungsgruppe im Vergleich mit der Kontrollgruppe mit einer fast 4fachen Mehrexpression von IL-10.

Im Vergleich dazu fallen die Werte in den beiden anderen Gegenüberstellungen gering aus. Eine verminderte IL-10-Expression wird in der „late-onset-group“ gegenüber der Kontrollgruppe verzeichnet und noch geringere Werte ergeben sich in der Gegenüberstellung der beiden Behandlungsgruppen, wo dieses Zytokin kaum noch nachweisbar ist (Abbildung 17).

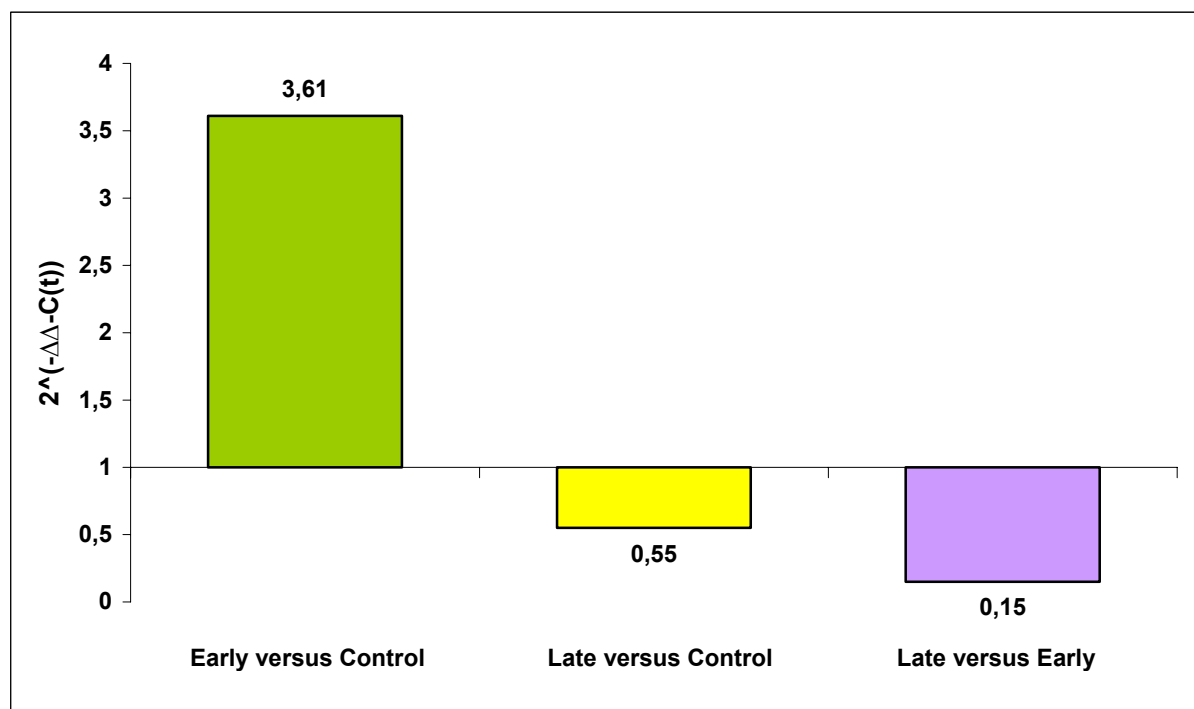


Abbildung 17: Darstellung der Werte für die IL-10-Expression in der Blase

3.3.1.4.4 Zusammenfassung der Th₂ –Zytokine

Im Gegensatz zu den Messwerten der Th₁-Zytokine, zeigen die Th₂-Zytokine TGF- β und IL-10 eine Mehrexpression in der frühen Behandlungsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Davon abweichend stellt sich die Interleukin-4 dar. Hier findet sich keine Mehrexpression in irgendeiner Vergleichsgruppe, stattdessen wird dieses Zytokin in den Behandlungsgruppen deutlich minderexprimiert.

Für die spätere Diskussion der Ergebnisse ist der Vergleich über die gemessenen Th₁- und Th₂-Zytokine in den einzelnen Gruppen hilfreich, einen Überblick dazu liefert Abbildung 18.

– Ergebnisse –

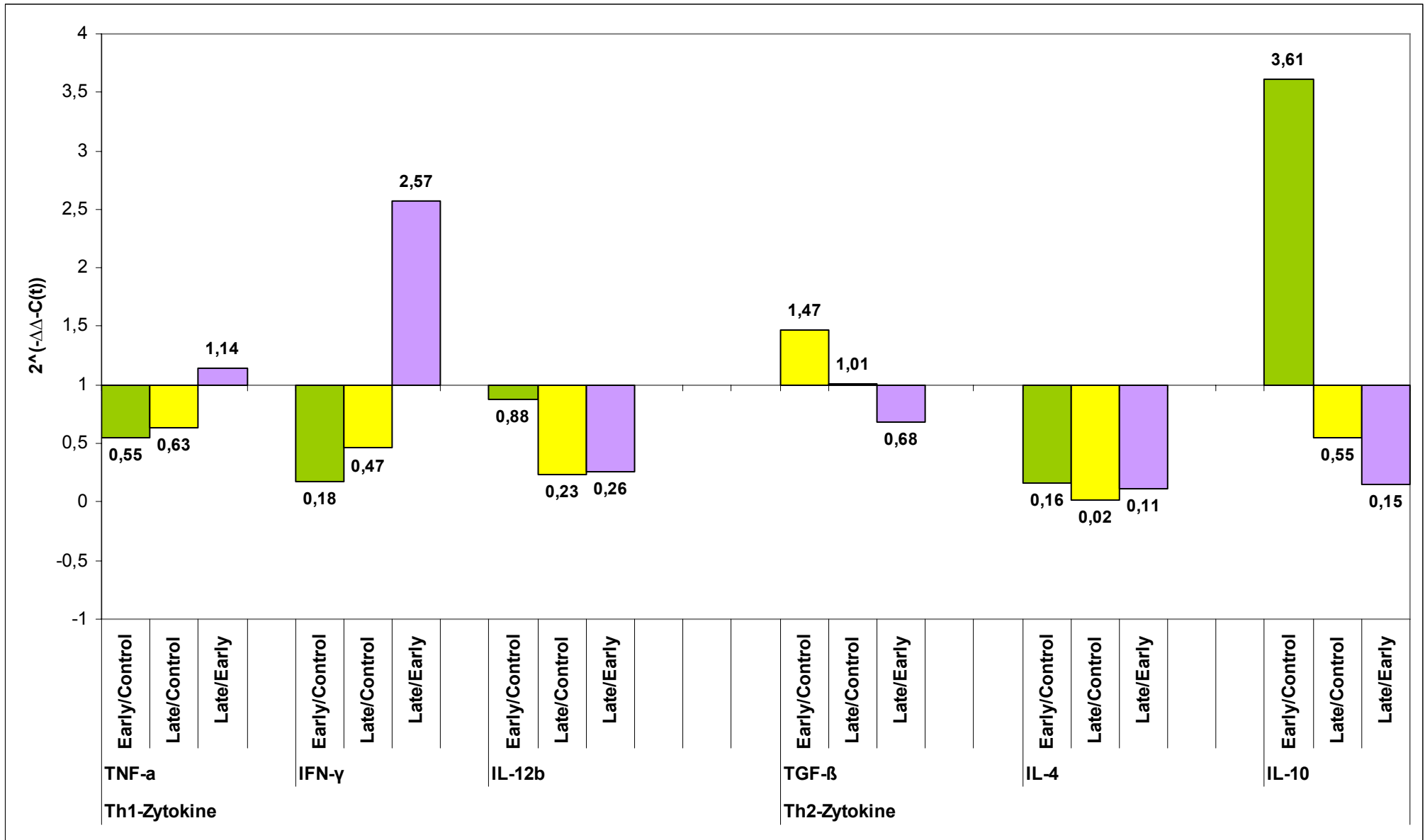


Abbildung 18: Überblick der Th₁-und Th₂-Zytokineexpression im Blasengewebe

3.3.2 Ergebnisse der Real-Time-PCR im Lymphknotengewebe

Im Rahmen der durchgeführten Versuchsreihen, wurde den Tieren neben Blasen-, auch Lymphknotengewebe entnommen.

3.3.2.1 Berechnung der relativen Expressionen

Die Werte $\Delta\Delta\text{-C(t)}$ - und $2^{-\Delta\Delta\text{-C(t)}}$ -Werte aller Zielgene ergeben sich aus den einzelnen Mittelwerten der Versuchstiere (siehe 3.3. Tab.16) und sind in den Tabellen 19 - 21 zusammengefasst.

Ebenso wie bei der Auswertung der Blasengewebe, wird in den folgenden Abschnitten die Zytokinexpression in den 3 Vergleichsgruppen anhand des $2^{-\Delta\Delta\text{-C(t)}}$ - Wertes beschrieben und ausgewertet.

Zuordnung	ZIELGEN	$\Delta\text{-c(t) EARLY}$	$\Delta\text{-c(t) CONTROL}$	$\Delta\Delta\text{-c(t)}$	$2^{-\Delta\Delta\text{-C(t)}}$
Th₁- Zytokine	TNF- α	3,57	3,5	0,07	0,95
	IFN- γ	4,2	2,92	1,28	0,41
	IL-12b	8,98	6,43	2,55	0,17
Th₂- Zytokine	TGF- β	0,85	1,95	-1,1	2,14
	IL-4	8,25	5,87	2,38	0,19
	IL-10	6,62	6,93	-0,31	1,24

Tabelle 19: $\Delta\text{C(t)}$ -, $\Delta\Delta\text{-C(t)}$ - und $2^{-\Delta\Delta\text{-C(t)}}$ – Werte aller Zielgene für die Gruppen „early-onset“ und „control-group“ im Lymphknoten

– Ergebnisse –

Zuordnung	ZIELGEN	$\Delta\text{-c(t) LATE}$	$\Delta\text{-c(t) CONTROL}$	$\Delta\Delta\text{-c(t)}$	$2^{-\Delta\Delta\text{-C(t)}}$
Th₁- Zytokine	TNF- α	2,89	3,5	-0,61	1,53
	IFN- γ	3,34	2,92	0,42	0,75
	IL-12b	8,94	6,43	2,51	0,18
Th₂- Zytokine	TGF- β	-0,23	1,95	-2,18	4,53
	IL-4	10,72	5,87	4,85	0,03
	IL-10	8,86	6,93	1,93	0,26

Tabelle 20: $\Delta\text{C(t)}$ -, $\Delta\Delta\text{-C(t)}$ - und $2^{-\Delta\Delta\text{-C(t)}}$ – Werte aller Zielgene für die Gruppen „late- onset“ und „control-group“ im Lymphknoten

– Ergebnisse –

Zuordnung	ZIELGEN	$\Delta\text{-c(t) LATE}$	$\Delta\text{-c(t) EARLY}$	$\Delta\Delta\text{-c(t)}$	$2^{-\Delta\Delta\text{-C(t)}}$
Th₁- Zytokine	TNF- α	2,89	3,57	-0,68	1,6
	IFN- γ	3,34	4,2	-0,86	1,82
	IL-12b	8,94	8,98	-0,04	1,03
Th₂- Zytokine	TGF- β	-0,23	0,85	-1,08	2,11
	IL-4	10,72	8,25	2,47	0,18
	IL-10	8,86	6,62	2,24	0,21

Tabelle 21: $\Delta\text{C(t)}$ -, $\Delta\Delta\text{-C(t)}$ - und $2^{-\Delta\Delta\text{-C(t)}}$ – Werte aller Zielgene für die Gruppen „late-onset“ und „early-onset“ im Lymphknoten

3.3.2.2 Th₁-Zytokine

3.3.2.2.1 Tumornekrosefaktor- α (TNF- α)

Die höchste Ausprägung von TNF- α findet sich in der Gegenüberstellung der beiden Behandlungsgruppen. Es zeigt sich eine fast doppelte Mehrexpression des Zytokins in der späten Behandlungsgruppe im Vergleich zur frühen Behandlungsgruppe. Der entsprechende Vergleich zwischen den Behandlungsgruppen und der Kontrollgruppe erbringt eine 1,5fach erhöhte Expression von TNF- α in der späten Behandlungsgruppe, während die frühe Behandlungsgruppe annähernd genauso viel TNF- α (0,95) exprimiert wie die Kontrollgruppe (Abbildung 19).

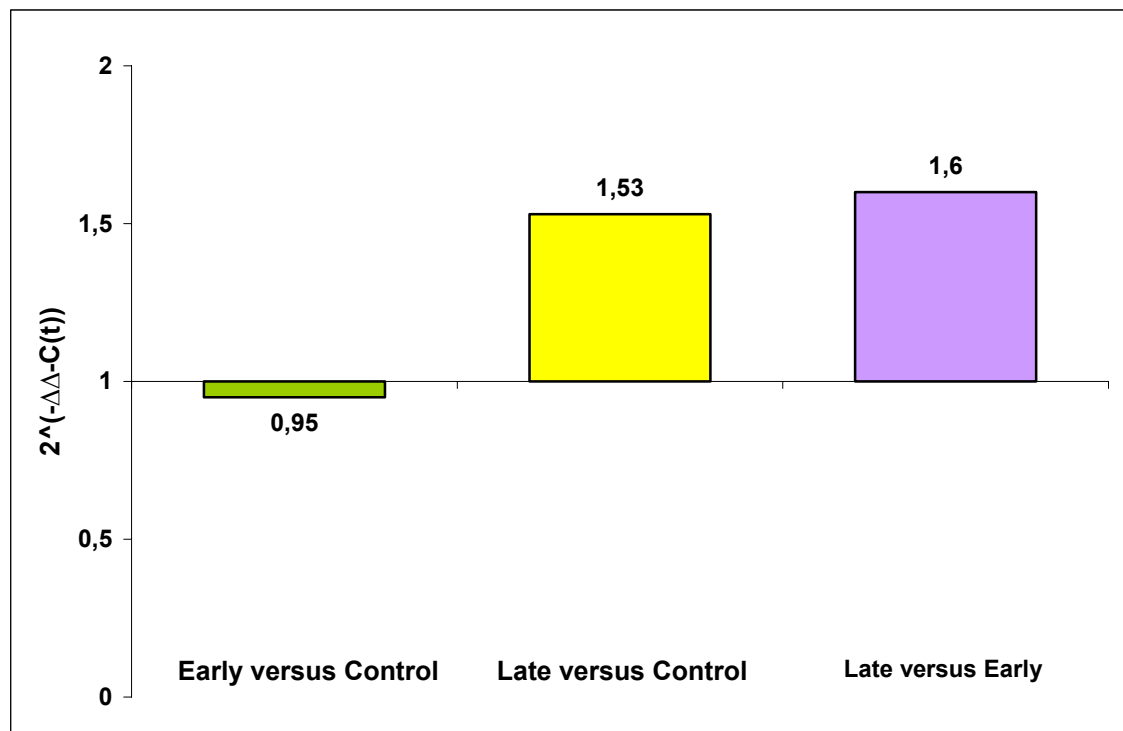


Abbildung 19: Darstellung der TNF- α -Messwerte in den 3 Vergleichsgruppen

3.3.2.2.2 Interferon- γ (IFN- γ)

Der Vergleich der beiden Behandlungsgruppen mit der Kontrollgruppe zeigt eine verminderte Zytokinexpression in den behandelten Gruppen, wobei die „early-onset-group“ die geringsten Werte aufweist, während die Werte der späten Behandlungsgruppe nicht ganz so stark reduziert sind.

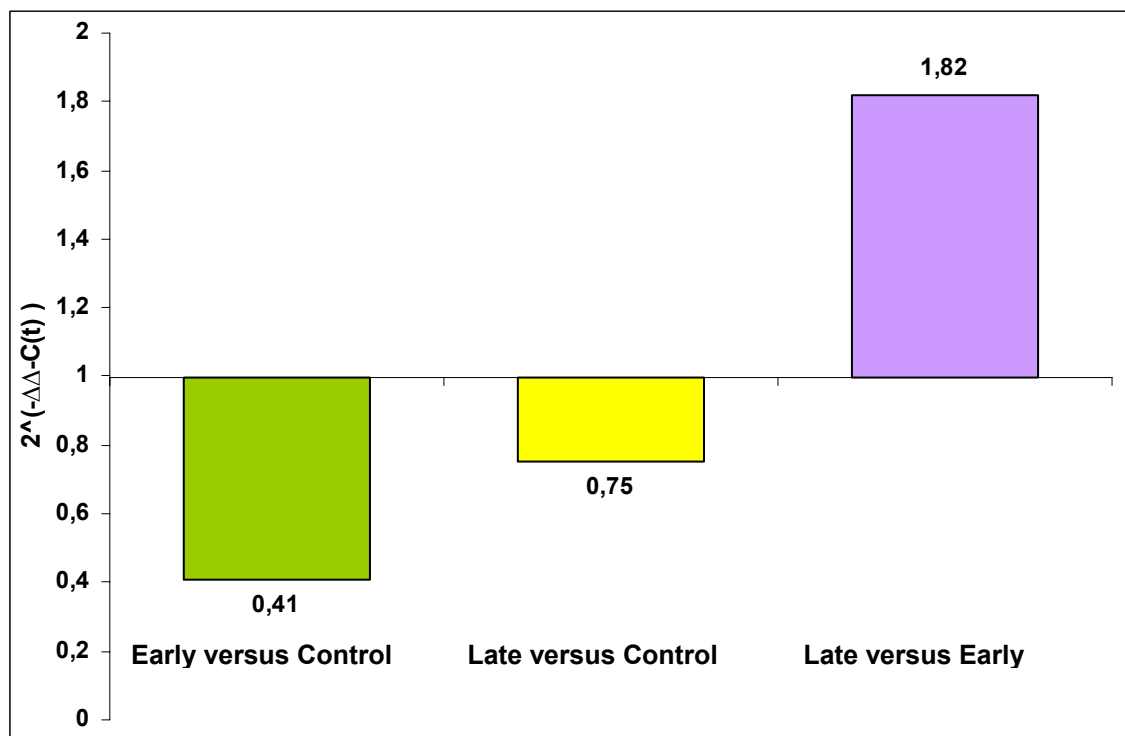


Abbildung 20: Darstellung der $2^{-\Delta\Delta C(t)}$ – Werte für IFN- γ im Lymphknoten

3.3.2.2.3 Interleukin- 12b (IL-12b)

Wie Abbildung 21 zeigt, findet sich der höchste $2^{-\Delta\Delta C(t)}$ -Wert erneut im Vergleich zwischen den beiden Behandlungsgruppen, wobei „late-onset-group“ und „early-onset-group“ das Zielgen in gleicher Höhe exprimieren.

Ähnlich wie im Falle von IFN- γ zeigt sich jedoch in der Gegenüberstellung mit der Kontrollgruppe, dass keine der Behandlungsgruppe das Zytokin in erhöhtem Maße exprimiert. Tatsächlich weisen beide ähnlich niedrige, verminderte Expressionswerte für IL-12b auf.

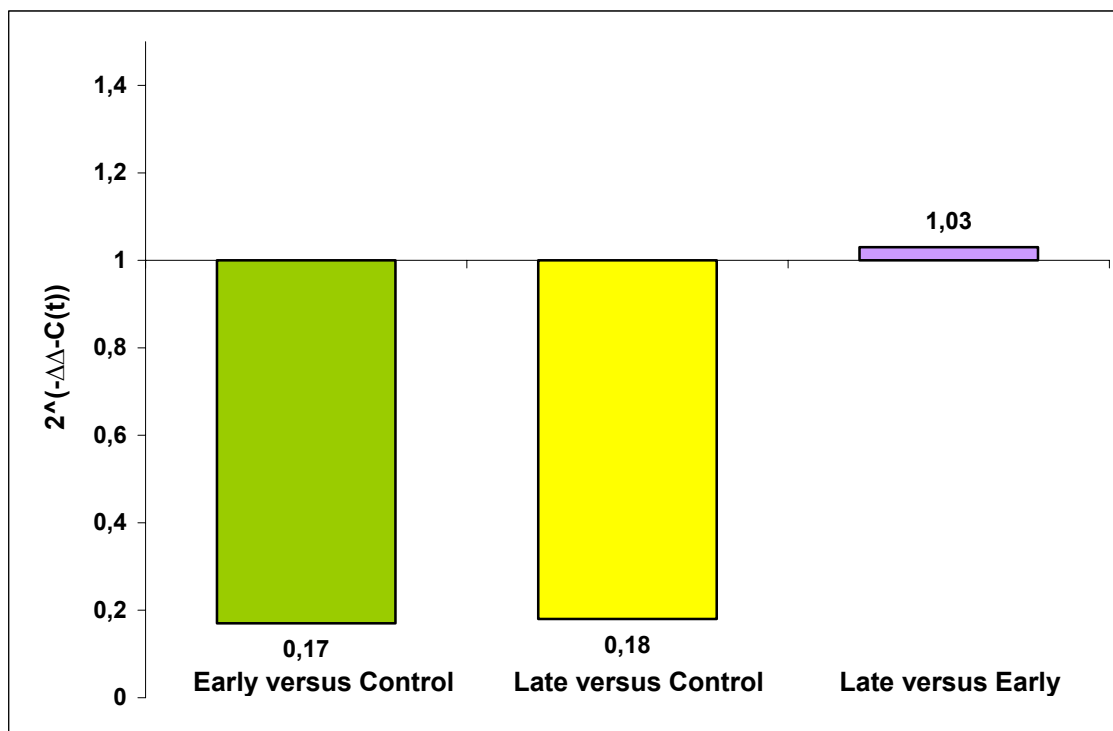


Abbildung 21: Darstellung der IL-12b Expression im Lymphknoten

3.3.2.2.4 Zusammenfassung der Th₁-Zytokine

Der folgende Abschnitt fasst die Expression der Th₁-Zytokine im Lymphknotengewebe zusammen.

Insgesamt lässt sich nur bei einem Zytokin, nämlich bei TNF- α , eine Mehrexpression der (späten) Behandlungsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe nachweisen. Die Expression der frühen Behandlungsgruppe beläuft sich in diesem Vergleich auf ähnliche Werte wie die der Kontrollgruppe.

Die beiden anderen Zytokine (IL-12b und IFN- γ) zeigen eine verminderte Expression der Behandlungsgruppen gegenüber der Kontrollgruppe, wobei vor allem die Messungen von IL-12b die grösste Diskrepanz der Werte aufweisen.

Insgesamt lässt sich für die Expression aller 3 Zytokine feststellen, dass die höchsten Werte innerhalb der Behandlungsgruppen auf die „late-onset-group“ entfallen.

3.3.2.3 Th₂- Zytokine

3.3.2.3.1 Transforming-growth-factor- β (TGF- β)

Die höchste Expression von TGF- β findet sich im Vergleich der „late-onset-group“ mit der „control-group“. Hier kommt es bei den spätbehandelten Tieren zu einer rund 5fach erhöhten Expression.

Die Vergleichsgruppe „early-versus-control“ zeigt ebenfalls eine vermehrte Ausschüttung dieses Zytokins, mit einer doppelten Mehrexpression im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 22).

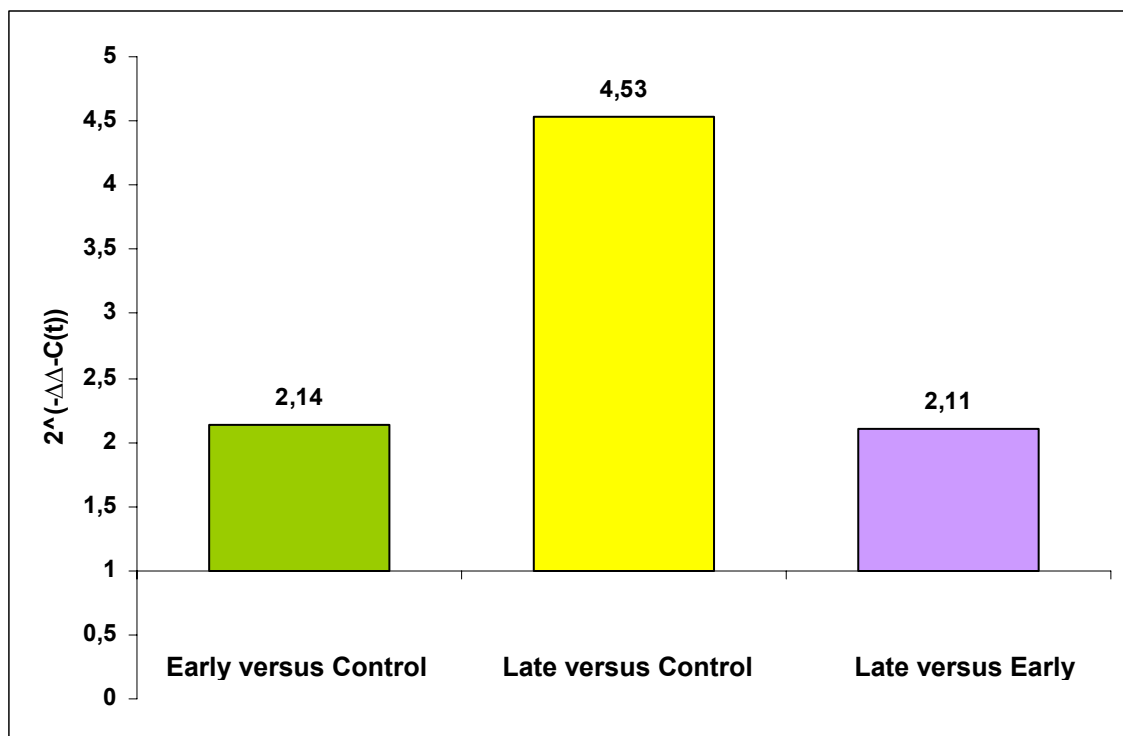


Abbildung 22: Darstellung der $2^{-\Delta\Delta C(t)}$ -Werte für TGF- β in den drei Vergleichsgruppen im Lymphknoten

3.3.2.3.2 Interleukin-4 (IL-4)

Wie bereits im Blasengewebe beobachtet, zeigt Interleukin-4 auch im Lymphknoten nur eine schwache Ausprägung (Abbildung 23).

Die geringste Expression zeigt sich im Vergleich zwischen der „late-onset-group“ und der „control-group“, IL-4 ist hier kaum nachweisbar. Auch die Gegenüberstellung „early-versus-control“ zeigt eine stark verminderte Ausprägung dieses Zytokins in der behandelten Gruppe. Der Vergleich der beiden Behandlungsgruppen zeigt nochmals die verminderte Expression von IL-4 in der spätbehandelten Gruppe.

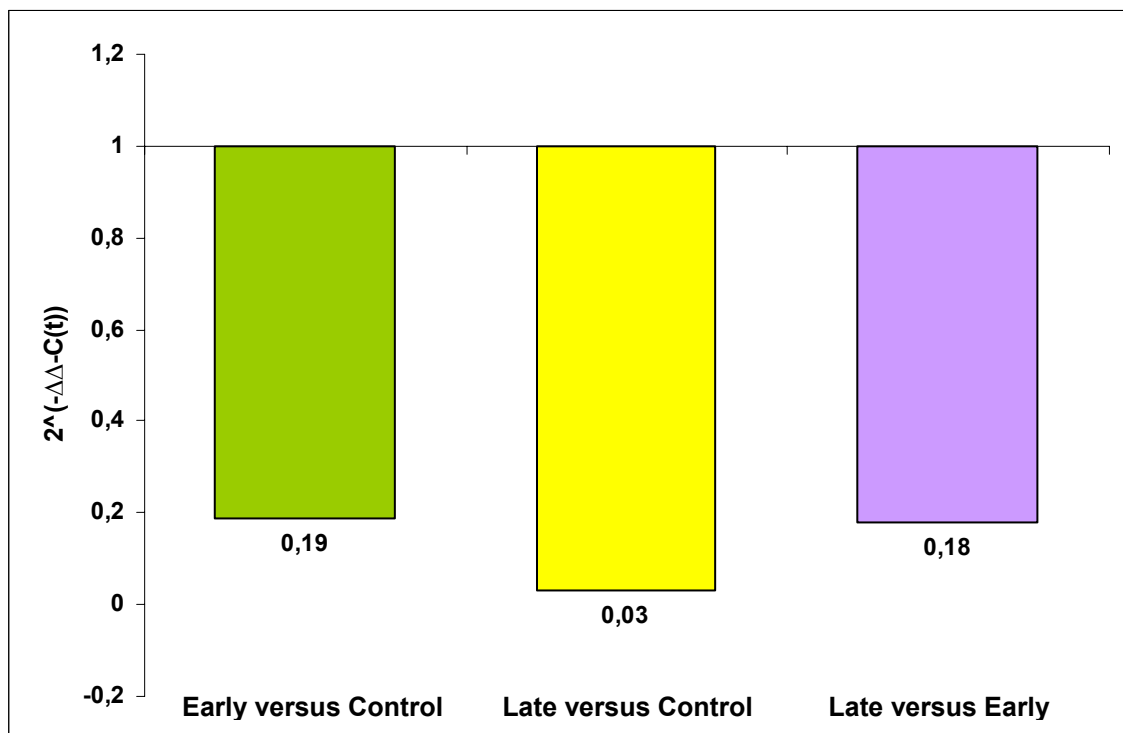


Abbildung 23: Darstellung der IL-4-Expression im Lymphknotengewebe

3.3.2.3.3 Interleukin 10 (IL-10)

Eine ähnliche IL-10-Expression findet sich in der frühen Behandlungsgruppe im Vergleich mit der Kontrollgruppe. Dahingegen zeigt sich in der Gegenüberstellung „late-versus-control“ ein stark verminderter Meßwert in der späten Behandlungsgruppe. Der Vergleich der beiden behandelten Gruppen ergibt eine ebenso ausgeprägte Minderexpression von IL-10.

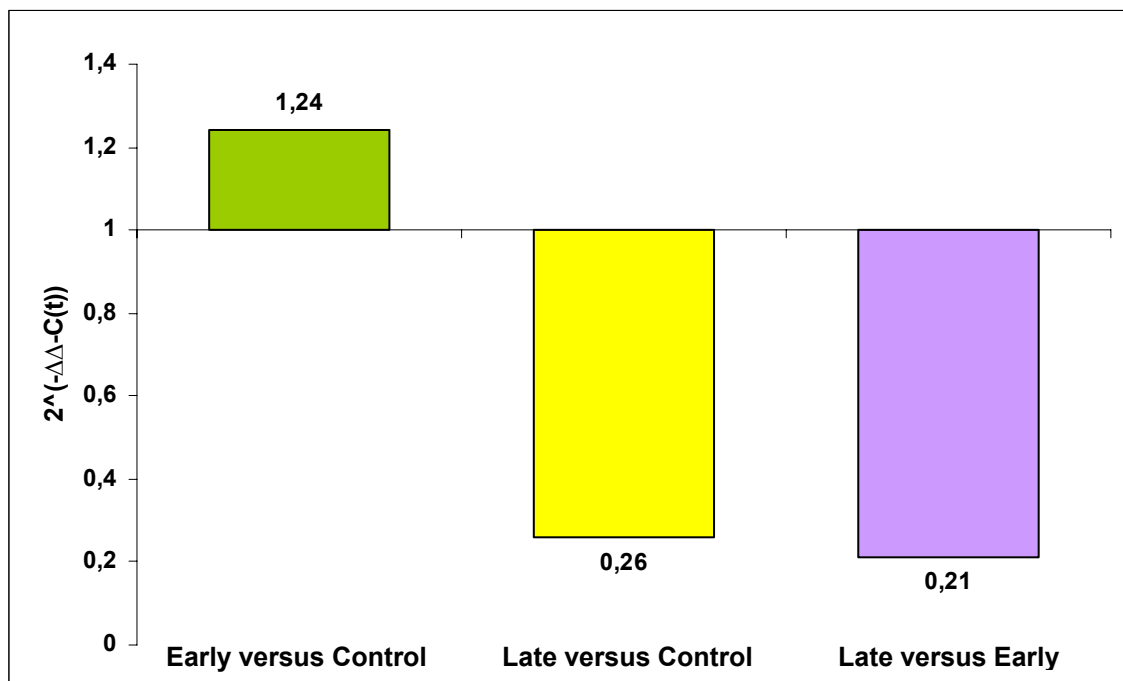


Abbildung 24: Darstellung der Interleukin-10-Expression im Lymphknoten

3.3.2.3.4 Zusammenfassung der Th₂ – Zytokine

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass alle drei gemessenen Zytokine in ihrer Grössenordnung und der Verteilung der Maximalexpression in den Vergleichsgruppen variieren.

Keine der Gruppen exprimiert vermehrt oder vermindert alle drei Zytokine, stattdessen finden sich erhöhte Zytokinwerte für TGF- β in beiden Behandlungsgruppen, wohingegen IL-10 nur in der „early-onset-group“ vermehrt nachweisbar ist. Im Fall von IL-4 zeigen beide Behandlungsgruppen stark verminderte Expressionswerte.

Abbildung 25 fasst alle Ergebnisse für die Messungen der sechs Zytokine im Lymphknotengewebe zusammen.

– Ergebnisse –

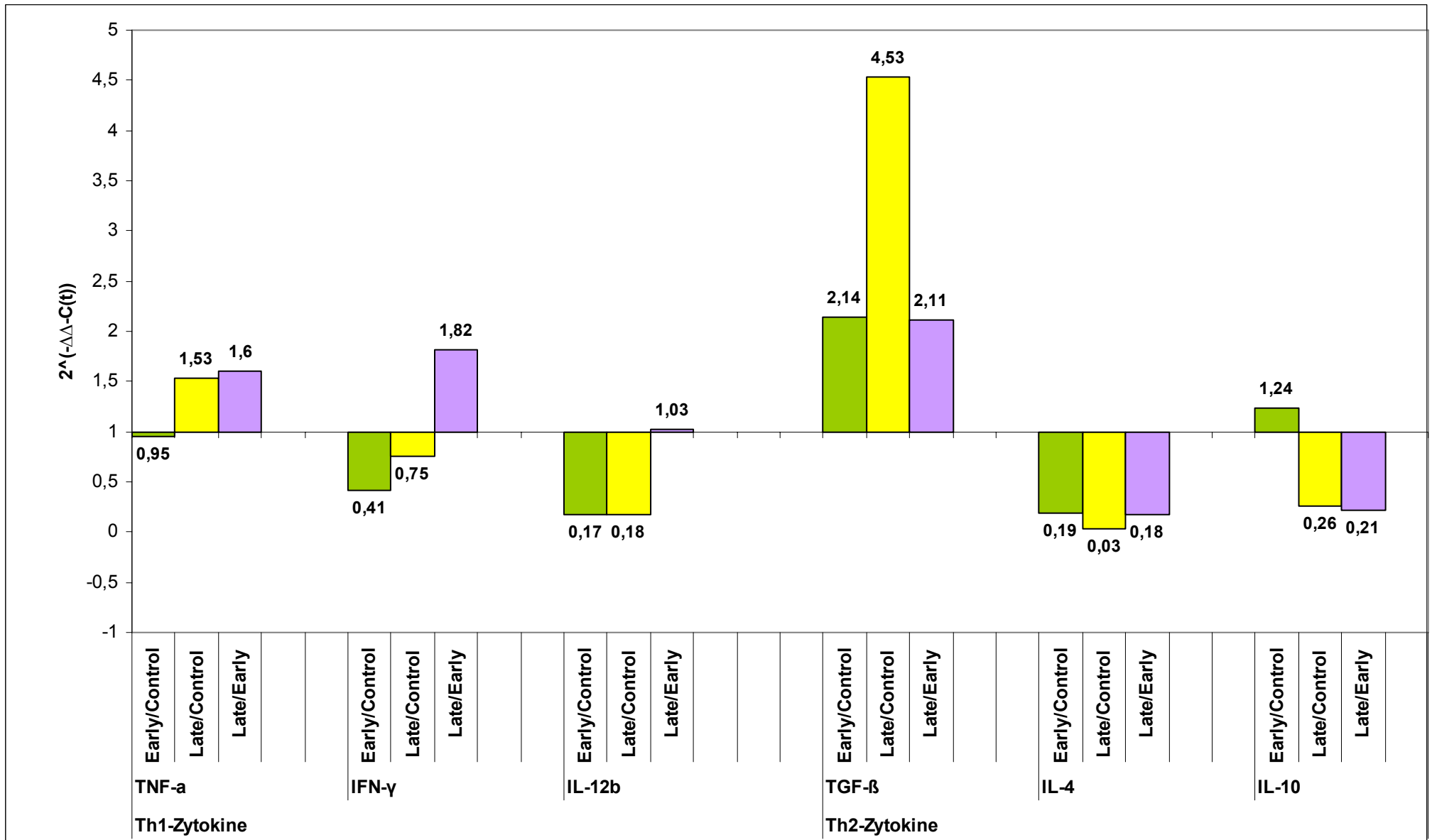


Abbildung 25: Darstellung der Expression von Th₁- und Th₂- Zytokinen im Lymphknoten

3.3.3 Vergleich der Expressionswerte zwischen Blasen- und Lymphknotengewebe

Obwohl es sich um zwei vollkommen verschiedene Gewebetypen handelt, ist die Verteilung der Zytokinexpression zwischen den untersuchten Gewebeproben von Interesse.

Im Bereich der Th₁-Zytokine lassen sich im Vergleich der beiden Gewebearten nur wenige Parallelen finden.

TNF α ist im Lymphknotengewebe bei den Behandlungsgruppen höher exprimiert als im Blasengewebe. Hier finden sich besonders im Vergleich „late versus control“ erhöhte Messwerte für dieses Zytokins.

Eine ähnliche Tendenz zeichnet sich bei IFN- γ ab. Dieses ist zwar insgesamt im Lymphknotengewebe nicht erhöht nachweisbar, sichtbar wird allerdings, dass die spätbehandelten Tiere eine annähernd gleiche Zytokinexpression aufweisen wie Tiere der Kontrollgruppe.

Ähnlich inhomogen zeigen sich die Ergebnisse für Interleukin-12b in Blase und Lymphknoten. Während das Zytokin im Lymphknotengewebe in allen drei Gegenüberstellungen nur minimal exprimiert wird, zeigt sich im Blasengewebe zumindest in der Gruppe „early-versus-control“ eine ähnliche Expression von IL-12b (Abbildung 26).

Betrachtet man die Zytokine der Th₂-basierten Immunantwort, so ist hier zunächst die Messung von TGF- β von Bedeutung. Beide Gewebearten zeigen eine erhöhte Expression dieses Zytokins in den Behandlungsgruppen. Im Lymphknotengewebe ist das Maß der Expression vor allem in der „late-onset-group“ sehr viel höher als im Blasengewebe, das Gleiche gilt für die Werte der „early-onset-group“ in den beiden Gewebearten.

Bei der Messung von Interleukin-10 lässt sich in beiden Geweben die gleiche Tendenz erkennen. Eine erhöhte (Blasengewebe) bzw. gleichwertige (Lymphknoten) Expression fand sich in der Vergleichsgruppe „early-versus-

control“. Eine Reduktion des Zytokins ist, in unterschiedlicher Ausprägung, in der Gegenüberstellung „late-versus-control“ nachweisbar.

Ebenso wie bei IL-12b sind die Messwerte für IL-4 in beiden Gewebearten, unabhängig von der Vergleichsgruppe deutlich erniedrigt. In beiden Geweben können ausserdem fast identische Ergebnisse in den Vergleichsgruppen gemessen werden (Abbildung 27).

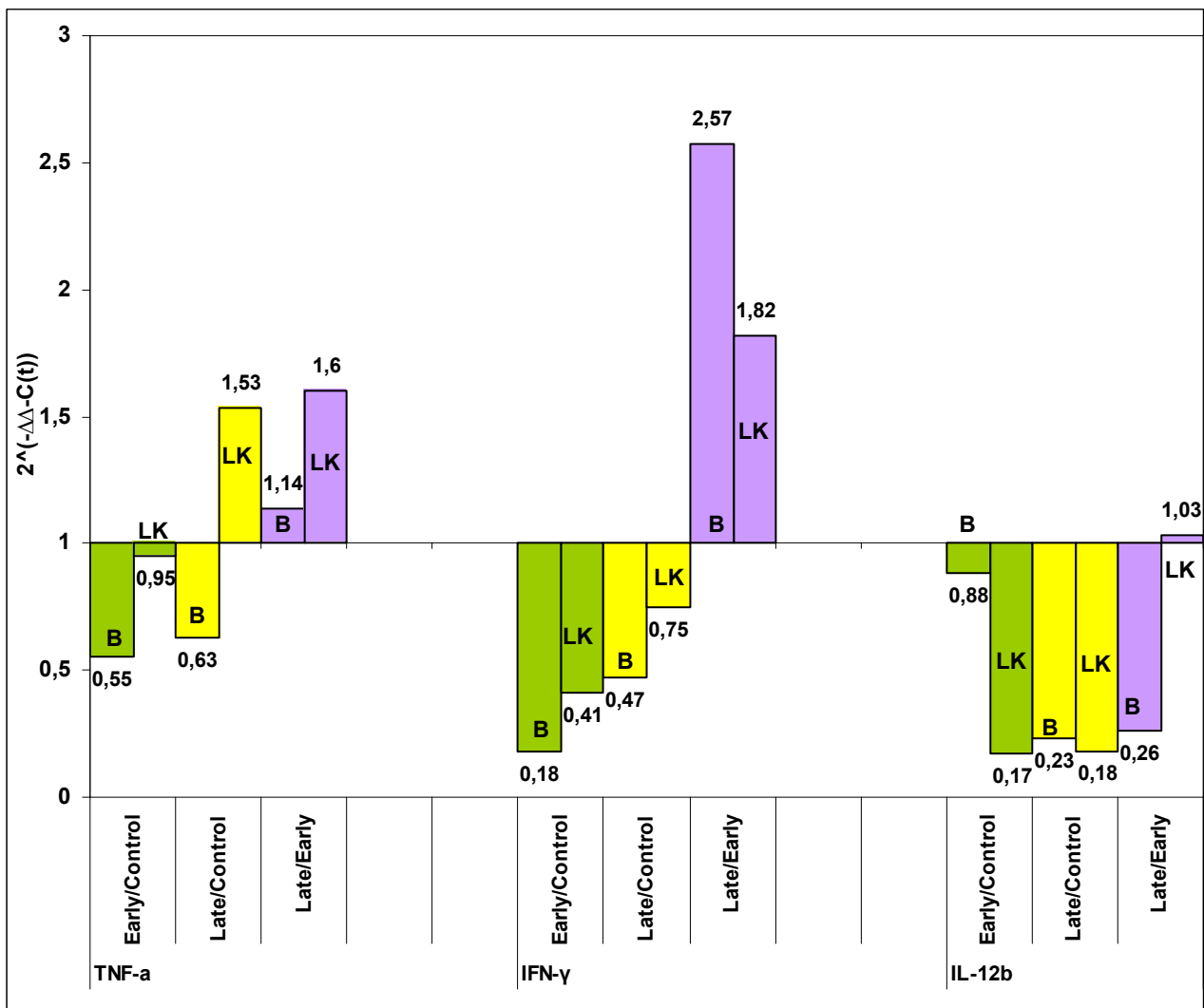


Abbildung 26: Vergleich der Th₁-Zytokine zwischen den einzelnen Gruppen in Blasen- und Lymphknotengewebe (B = Blase, LK =Lymphknoten)

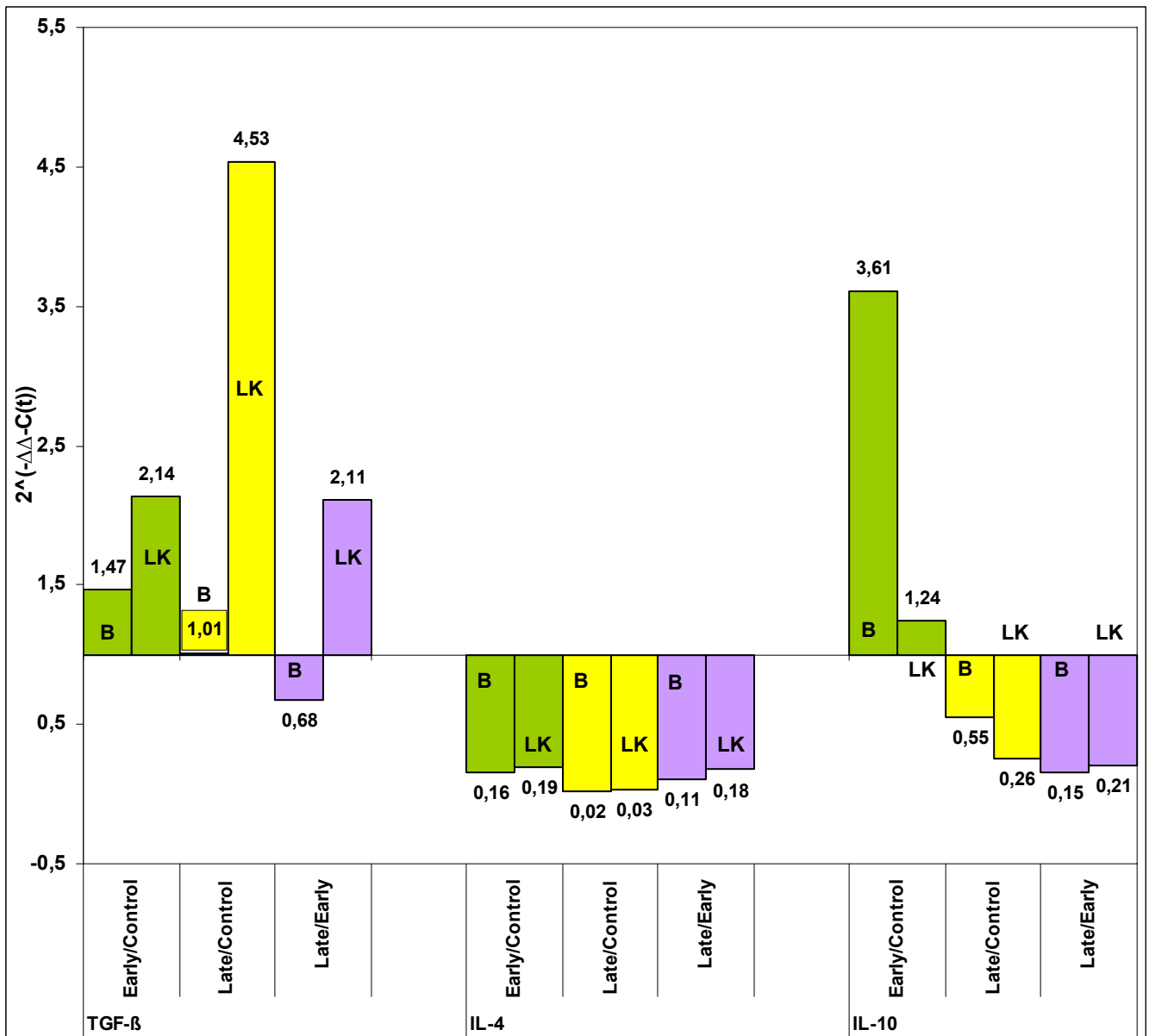


Abbildung 27: Vergleich der Th₂-Zytokine zwischen den einzelnen Gruppen in Blasen- und Lymphknotengewebe

4 Diskussion

Das Harnblasenkarzinom ist einer der zehn häufigsten malignen Tumore des Menschen. Bei Diagnosestellung weisen 70% der Patienten ein nicht-muskelinvasives Karzinom auf, wohingegen bei 20% der Betroffenen ein invasiv-wachsendes und bei 5% bereits ein metastasiertes Tumorleiden vorliegt (Dalbagni, 2007).

Die anatomische Lage der Blase sowie ihre gute Zugänglichkeit von extern erlaubt es, lokale Therapieverfahren auf dem transurethralen Weg durchzuführen. Neben der operativen Behandlung stehen je nach Tumorstadium immun- und chemotherapeutische Therapieoptionen zur Verfügung (Jocham et Miller 2003). Allerdings kommt es beim nicht-muskelinvasiven Blasenkarzinom trotz erfolgreicher Ersttherapie in 70% der Fälle zu einem Rezidiv, oft auch verbunden mit einem höheren Tumorstadium (Progression), daher ist die Rezidivprophylaxe von entscheidender Bedeutung (van der Meijden et al, 2007).

Für Patienten mit Karzinomen der sog. Hochrisikogruppe (Cis, pT1G3) gilt die postoperative intravesikale Immuntherapie mit BCG derzeit als Standard der Prophylaxetherapie. Nachteilig sind dabei jedoch die ausgeprägten Nebenwirkungen (Witjes et al, 2008).

Primär kam BCG als Impfstoff gegen die Tuberkulose zum Einsatz, wurde dann aber auch als potenter Wirkstoff in verschiedenen therapeutischen Ansätzen eingesetzt, nachdem man ihm immunstimulatorisches Potential nachweisen konnte. Dieses äußert sich u.a. durch erhöhte Zytokinexpression (Tokunaga 1984; Sparwasser 1997).

Untersuchungen am Harnblasengewebe nach BCG-Instillation konnten unspezifische, lokale Entzündungsreaktion im Gewebe nachweisen (Ratliff et al, 1986; Prescott et al 1990; De Boer et al, 1992). In diversen Studien zeigte sich, dass BCG eine ausgeprägte Einwanderung von Granulozyten und mononukleären Zellen ins Harnblasengewebe bewirkt. Gleichzeitig lassen sich

im Urin Zytokine der Interleukinfamilie, sowie auch multiple andere Entzündungsmediatoren nachweisen. Hieraus zog man die Schlussfolgerung, dass BCG vor allem eine zelluläre Immunantwort des angeborenen Immunsystems bewirkt (¹Böhle et al, 2003).

Bei den nachgewiesenen Zytokinen handelte es sich vor allem um Vertreter der Interleukinfamilie (IL-1, IL-2, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-18), aber auch TNF- α und IFN- γ konnten in erhöhten Mengen im Urin gemessen werden (Prescott et al, 1990; Böhle et al, 1990; de Boer et al, 1992; Thalmann et al, 2000).

Untersuchungen am murinen, orthotopen Blasenkarzinommodell ergaben ebenfalls eine Th₁-gewichtete Immunantwort mit signifikant erhöhten Messwerten für IFN- γ (de Boer et al, 2003). Allerdings lassen sich auch Zytokine der Th₂-gewichteten Immunantwort, wie IL-5 und IL-10, nachweisen, während Interleukin-4, als typischer Vertreter der Th₂-Zytokine, deutlich geringer im Urin nachweisbar war (McAveny et al, 1994; ¹Böhle et al, 2003).

Genauere Untersuchungen von BCG konnten bald aufklären, dass sich die immunstimulative Wirkung unter anderem auf die bakterielle DNA, speziell auf ihre spezifischen CpG-Motive zurückführen lässt (Krieg, 1995). Diese Motive bestehen aus unmethylierten CG-Motiven und aktivieren das angeborene und indirekt auch das adaptive Immunsystem. Vermittelt wird diese Reaktion durch Bindung an den Toll-like-receptor-9 (Hemmi et al, 2000; Krieg, 2002).

Die immunstimulatorische Wirkung dieser CpG-Motive beinhaltet eine Th₁-gesteuerte Immunantwort mit Aktivierung und Maturation Dendritischer Zellen und vermehrter Antigenpräsentation (Krieg, 2002). Ausserdem kommt es zu einer direkten B-Zell-Aktivierung und -Proliferation, sowie zur erhöhten Zytokinexpression durch immunkompetente Zellen (²Yamamoto S et al, 1992; Yamamoto S et al, 1998). CpG-ODN gelten daher als das stärkste, bisher bekannte, B-Zell Mitogen (Krieg et al, 1995). Nachdem es möglich wurde diese Oligodeoxynucleotide synthetisch herzustellen, ergibt sich ein neuer Therapieansatz für verschiedene Krankheitsbilder.

Unsere Arbeitsgruppe untersuchte die Wirkung von CpG-ODN (1668) beim nicht-muskelinvasiven Blasenkarzinom und konnte eine ausgeprägte entzündliche Reaktion des Gewebes (v.a. durch Makrophagen), sowie eine antineoplastische Wirkung nachweisen (Hegele et al, 2004; Hegele et al, 2005). Wie bereits erwähnt, wird die Wirkung von CpG-ODN über den TLR-9-Rezeptor vermittelt, welcher im Endosom der Zelle lokalisiert ist (Ahmad-Nejad P, 2002). Beim Menschen findet er sich wahrscheinlich physiologischerweise nur auf zwei Zelltypen (B-Zellen und plasmazytoiden dendritischen Zellen (PDC)), wohingegen er bei der Maus auf fast allen Zellen des Immunsystems nachweisbar ist (Kadowaki et al, 2001; Krug et al, 2002). TLR-9 induziert in diesen Zellen die Transkription verschiedener Zytokine und Chemokine, wodurch dann ein typisches Th₁-Zytokinmilieu entsteht (Krieg, 2002).

Die Untersuchungen am murinen, orthotopen Harnblasenkarzinommodell im Rahmen dieser Doktorarbeit zeigen insgesamt ein uneinheitliches Bild der Zytokinexpression, das in der gewählten Versuchsanordnung teilweise nicht mit der erwarteten Th₁-Reaktion im Einklang steht. Wir konnten sowohl erhöhte als auch verminderte Expressionswerte der Th₁- und Th₂-Zytokine in den Behandlungsgruppen im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe nachweisen.

Diese Unterschiede lassen sich wahrscheinlich zum einen durch den Behandlungszeitpunkt ausmachen, zum anderen durch das Intervall zwischen CpG-Stimulation und Opferung der Tiere bzw. dem sich daraus ergebenden Meßzeitpunkt erklären. So zeigen Tiere der frühen Behandlungsgruppe („early-onset-group“) eine verminderte Expression der Th₁-Zytokine Interleukin-12b, TNF- α und IFN- γ , jedoch eine verhältnismäßig hohe Expression der Th₂-Zytokine TGF- β und IL-10.

Ein möglicher Erklärungsansatz ist, dass diese Tiere zu einem sehr frühen Zeitpunkt (erster Versuchstag) regelmäßig CpG-ODN (1668) - als Dauerstimulation - erhielten. Weiterhin ist zu beachten, dass bis zur Tötung der Tiere und der Gewebeentnahme zwölf Tage vergingen, was wiederum für die Abläufe der Immunantwort eine entscheidende Rolle spielt. Da die TLR-

vermittelte, initiale Immunantwort innerhalb von wenigen Stunden bis Tagen abläuft (Janeway et al, 2002), besteht die Möglichkeit, dass zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme die initiale Stimulation bereits vorüber war und bereits gegenregulatorische Effekte zur Eindämmung der „iatrogen induzierten“ Dauerstimulation eingesetzt haben. Typisch hierfür ist die Überexpression von TGF β und IL 10.

Ähnlich verhalten sich die Werte der spätbehandelten Tiere („late-onset-group“): Alle Zytokine der Th₁-Immunantwort sind vermindert exprimiert und auch die Zytokine der Th₂-basierten Immunantwort (IL-4, IL-10) zeigen eine stark reduzierte Expression.

Auch hier ist wieder das Behandlungsschema in die Beurteilung miteinzubeziehen: Tiere dieser Gruppe erhielten erst am fünften Tag nach Tumorinstillation CpG-ODN (1668), es vergingen also sieben Tage bis zum Ende der Versuchsreihe und der Entnahme der Gewebe. Beurteilt man in diesem Zusammenhang wieder den zeitlichen Verlauf der Immunreaktionen ist es möglich, dass zu diesem Zeitpunkt die primäre Immunantwort nicht mehr aktiv ist und die Th₂-gewichtete Immunreaktion noch nicht vollständig eingetreten ist.

Die Wirkung von CpG-ODN im murinen Harnblasenkarzinommodell untersucht auch die Arbeitsgruppe Töttermann aus Uppsala. Sie konnten zeigen, dass die intravesikale Applikation von CpG-ODN eine Th₁-gewichtete Immunantwort bewirkt und dass der Einsatz von CpG in Bezug auf die Senkung der Tumorlast, sowie auf die Anlage einer längerfristigen Immunität und insbesondere auch hinsichtlich der Überlebenszeit der behandelten Tiere deutlich bessere Effekte zeigt als BCG (Ninalga et al, 2005). Im Gegensatz dazu stehen unsere Ergebnisse, wo sich kurzfristig keine Dominanz der Th₁-gewichteten Immunantwort zeigen lässt, sondern teilweise die Zytokine der Th₂-Immunantwort überwiegen. IL-4 jedoch, das als starker Initiator der Th₂-gewichteten Immunantwort gilt, konnte weder in der frühen, noch in der späten Behandlungsgruppe in erhöhter Konzentration gemessen werden, tatsächlich

ist es bei beiden Behandlungsgruppen kaum nachweisbar. Diese Resultate decken sich auch mit den Ergebnissen aus Versuchen mit BCG, eine endgültige Erklärung liegt dafür jedoch nicht vor (McAveny et al, 1994).

Betrachtet man nun im Vergleich dazu die klinischen Daten der einzelnen Tiergruppen, so finden sich auch hier Unterschiede anhand des Behandlungsschemas.

Im Gegensatz zu früheren Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe (Hegele et al, 2005), verzeichnen wir in allen drei Tiergruppen einen Gewichtsverlust, welcher am stärksten in der „early-onset-group“ und am geringsten in der „late-onset-group“ ausgeprägt ist. Dieser Aspekt lässt sich weder durch die Behandlung, noch durch die wiederholten Narkosen erklären. Denn auch die Tiere der Kontrollgruppe verlieren Gewicht, obwohl sie keine wiederholten Narkosen oder intravesikale Instillationen erhalten. Es lässt sich auch nicht durch die ausbleibende Behandlung und damit durch einen frühen, tumorassoziierten Gewichtsverlust erklären, da bei den Tieren der frühen Behandlungsgruppe ein höherer Gewichtsverlust nachweisbar ist.

Weiterhin wird das Auftreten einer Makrohämaturie, sowie der Zeitpunkt an dem diese das erste Mal klinisch apparent wird untersucht. Es zeigt sich, dass in der frühen Behandlungsgruppe weniger Tiere eine Hämaturie entwickeln, welche auch durchschnittlich später auftritt. Dagegen zeigt sich bei den Tieren der Kontrollgruppe die Hämaturie zu einem früheren Zeitpunkt und betrifft auch mehr Tiere. Es scheint also, dass der frühe Einsatz von CpG-ODN (1668) das Einsetzen der Hämaturie verzögert, da auch die späteinsetzende Behandlung, ebenso wie die ausbleibende Behandlung, eine frühe Makrohämaturie begünstigt.

Ein weiterer Diskussionspunkt ist die Sterberate der Tiere unter Berücksichtigung des Behandlungsschemas. In beiden Behandlungsgruppen versterben insgesamt drei Tiere, in der Kontrollgruppe dagegen kein Einziges. Wir führen das auf die wiederholten Narkosen zurück, denen die Tiere der Behandlungsgruppe aufgrund der regelmäßigen intravesikalen Instillationen ausgesetzt sind und gehen davon aus, dass dies die Tiere stark beansprucht und geschwächt hat.

Vergleichend kann also die Aussage getroffen werden, dass die unterschiedlichen Behandlungszeitpunkte in den molekularbiologischen Untersuchungen keine relevanten Unterschiede ergeben. Bei den klinischen Parametern dagegen scheinen sie eine gewisse Relevanz zu haben, obwohl auch hier kein einheitliches Bild zu erkennen ist.

Neben Blasengewebe werden die Lymphknoten der Tiere untersucht, um zu eruieren inwieweit die intravesikale Instillation von CpG-ODN (1668) dort Veränderungen im Zytokinmilieu bewirkt.

Vertreter der Th₁-Zytokine zeigen in den Lymphknoten ein ähnliches Verteilungsschema wie im Blasengewebe. Es kann eine verminderte Expression der Th₁-Zytokine IFN- γ und IL-12b in beiden Behandlungsgruppen gemessen werden. TNF- α dagegen ist in der späten Behandlungsgruppe deutlich höher exprimiert und auch die frühe Behandlungsgruppe zeigt annähernd gleiche Expressionswerte wie die Kontrollgruppe.

Die Zytokine der Th₂-gewichteten Immunantwort zeigen im Lymphknoten eine ähnliche Ausprägung wie im Blasengewebe. TGF- β und IL-10 können in erhöhter Expression in beiden Behandlungsgruppen nachgewiesen werden, wobei TGF- β vor allem in den Geweben der „late-onset-group“ die höchsten Expressionslevel aufweist, während Interleukin-10 die stärkste Ausprägung in der „early-onset-group“ hat.

Ähnlich zu den Ergebnissen aus der Blase verhalten sich die Expressionwerte von Interleukin-4 im Lymphknoten. Aus den Untersuchungen der frühen und späten Behandlungsgruppe resultieren minimale Messwerte, so dass man von einer extrem verminderten Expression sprechen kann.

Anhand der ähnlichen Ergebnisse in zwei unterschiedlichen und räumlich voneinander getrennten Geweben stellt sich die Frage nach dem Wirkmechanismus der immunstimulativen ODN's. Die oben beschriebenen Resultate legen nahe, dass sich deren Wirkung nicht nur in der Blase entfaltet, wo CpG-ODN lokal durch intravesikale Instillation verabreicht wird, sondern gleichzeitig eine systemische Wirkkomponente auf die umliegenden

Lymphknoten hat und dort eine ähnliche Reaktion auslöst. Aufgrund der bekannten Wirkmechanismen von TLR-Agonisten im Sinne einer Aktivierung der APCs direkt am Applikationsort mit anschließender Migration in die regionären Lymphknoten und dortiger T- (und B-) Zell Aktivierung, ist eine Mitreaktion dieser Lymphknoten auch durchaus zu erwarten.

In vorausgegangenen *in-vivo* Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe am orthotopen, murinen Blasenkarzinommodell konnte gezeigt werden, dass sich CpG-ODN (1668) nach intravesikaler Instillation in der Submukosa der Harnblasenwand anreichern. Dort aktivieren und stimulieren sie wahrscheinlich insbesondere antigenpräsentierende Zellen und initiieren so die resultierende Immunantwort. Wie dies allerdings genau vonstatten geht, ist bisher noch unklar und sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Weitere Untersuchungen am subkutanen, murinen Urothelkarzinommodell belegen, dass die peritumorale Applikation von CpG-ODN (1668) nicht nur lokale, sondern auch systemische Wirkung zeigt. Neben dem Rückgang der Tumorlast wird eine ausgeprägte Infiltration der Blasenwand mit Makrophagen und Lymphozyten histologisch nachgewiesen (Hegele¹ et al, 2004).

In weiterführenden Studien konnte unsere Arbeitsgruppe nachweisen, dass sich diese Effekte auch ins orthotope, murine Harnblasenkarzinommodell übertragen lassen und dort bereits nach einmaliger intravesikaler Instillation von CpG-ODN (1668) die beschriebenen Effekte nachzuweisen sind (Hegele et al, 2005).

Wie bereits beschrieben, werden die CG-Motive der immunstimulativen Oligodeoxynukleotide über den Toll-like-receptor 9 erkannt. Dieser Rezeptor ist im Endosom der Zelle lokalisiert, kann aber auf bestimmte Signale hin an die Zelloberfläche gelangen (Ahmad-Nejad, 2002; Dasari et al, 2005). In verschiedenen *in-vitro* und *in-vivo* Studien konnte gezeigt werden, dass TLR-9 nicht nur von immunkompetenten, sondern auch von Karzinomzellen exprimiert werden kann.

So exprimieren zum Beispiel epitheliale Zellen des Respirationstrakts und des Kolons TLR-9, aber während die respiratorischen Zellen *in-vitro* durch CpG-

ODN stimulierbar sind, zeigt sich dieser Effekt bei epithelialen Zellen des Kolons nicht (Platz et al, 2004; Pedersen et al, 2005).

Im Bereich der Karzinomzellen konnte TLR-9 u.a. bei der chronisch lymphatischen Leukämie, sowie beim Burkitt-Lymphom nachgewiesen werden (Decker et al, 2001; Henault et al, 2005). Trotzdem scheint die alleinige Anwesenheit von TLR-9 auf einer Tumorzelle nicht immer auszureichen, um die immunstimulatorische Wirkung der CpG-Oligodeoxynukleotide zu vermitteln (Wang et al, 2005). Durch all diese Erkenntnisse könnte die Gruppe der TLR-9 Agonisten als Therapieansatz interessant werden, möglicherweise jedoch auch gewisse Risiken bergen.

Unsere Arbeitsgruppe untersuchte murine Urothelkarzinomzelllinien (MB49), um diese Frage für das Harnblasenkarzinom zu beantworten und konnte zeigen, dass TLR-9 auf MB49-Zellen nicht exprimiert wird (Olbert et al, 2004). Außerdem konnten *in-vitro* Stimulationsversuche mit CpG-ODN (1668) an MB49-Zellen zeigen, dass weder ein proapoptotischer Effekt, noch eine Wachstumshemmung oder Nekrose an den Zellen induziert wird (Hegele² et al, 2004). Ein direkter Effekt von CpG-ODN auf die Tumorzellen kann in unserem Modell also nahezu ausgeschlossen werden.

Die antineoplastische Wirkung von Cpg-ODN (1668) ist jedoch im humanen System nicht immer allein immunologisch sondern u.U. auch durch eine direkte Interaktion mit der Tumorzelle vermittelt. Dies trifft ebenfalls für die antineoplastische *in-vivo* Wirkung von BCG zu (Ratliff et al, 1987; Suttman et al, 2006; Brandau et al, 2007). Ob direkte Effekte von TLR-Agonisten auf TLR-positive Tumorzellen auch negative Effekte im Sinne einer Wachstumsstimulation haben können, ist heute noch völlig unklar.

Derzeit werden von unserer Arbeitsgruppe Versuche an TLR-9 knock-out Mäusen durchgeführt, um umfangreichere Kenntnisse über die Signalvermittlung zu erlangen. Da weitere Untersuchungen und Ergebnisse über die Wirkung immunstimulativer DNA am Harnblasenkarzinom noch nicht vorliegen, ist es derzeit nicht möglich all diese Fragen abschliessend zu beantworten.

Auch andere Bereiche der Onkologie betrachten die CpG-ODN als vielversprechende neue Therapieoption. Es existieren diverse Studien am Tiermodell, die die antineoplastische Wirkung an unterschiedlichen Tumorentitäten untersuchen. Die Gruppe um Baines beschäftigt sich mit der Wirkung am Zervixkarzinom, wo sich ein Zusammenhang zwischen Tumorregression und erhöhtem Aufkommen CD-8⁺T-Zellen nachweisen lässt (Baines et al, 2003). Andere Forschungsgruppen liefern ähnliche Ergebnisse für das Kolonkarzinom und das maligne Melanom und konnten einen Zusammenhang zwischen Tumorregression und Aufkommen von NK-Zellen nachweisen (Heckelsmiller et al, 2002; Kawarada et al, 2001).

In anderen Tiermodellen wird die Wirkung von CpG-ODN in Kombination mit anderen Therapien (Strahlen-, Antikörper- und Chemotherapie) untersucht. Es zeigt sich, dass CpG-ODN die Wirkung der Strahlen- und Chemotherapien bei einigen Karzinomen (z.B. Mamma-Karzinom) verbessern und außerdem die Effektivität der Chemo- und Antikörpertherapie steigern (Woolridge et al, 2003; Mason et al, 2006).

TLR-9-Agonisten stehen aber auch in anderen medizinischen Bereichen im Mittelpunkt des Interesses. 1998 publizierten Zimmerman et al den ersten erfolgreichen Therapieversuch mit CpG-ODN bei der bisher letal verlaufenden Infektion mit *Leishmania major* im Mausmodell (Zimmermann et al, 1998). Später konnten sie auch den wirkungsvollen Einsatz von CpG-ODN als post-expositions-Therapie bei diesem Krankheitsbild nachweisen. Die erhöhte Ausschüttung von IL-12 durch die dendritischen und NK-Zellen stimuliert die T-Helferzellen zur IFN- γ Produktion und aktiviert dadurch Makrophagen, die auf diesen Reiz hin das Pathogen eliminieren (Dittmer et al, 2003). Weitere Untersuchungen erbrachten vielversprechende Ergebnisse für den Einsatz von CpG-ODN als potenten Impfstoff bei Malaria und Hepatitis B (Dalpke et al, 2001).

Aussichtsreich erscheint auch der Einsatz von CpG-ODN bei typischen Th₂-dominierten Erkrankungen wie Asthma oder Allergien. Die Zellen produzieren nach Stimulation mit CpG-ODN weniger Ig-E gegen das bestehende Allergen

als vorher (Bohle et al, 1999). Es wird derzeit angenommen, dass die sonst dominierende Th₂-Immunantwort zugunsten der artifiziell induzierten Th₁-Reaktion verdrängt wird (Hussain et al. 2001).

Trotz der viel versprechenden Ergebnisse bei der Anwendung von CpG-ODN basieren diese auf der Grundlage von Tiermodellen. Da allerdings Unterschiede im Wirkungsbereich der immunstimulativen DNA zwischen Mensch und Tier bestehen, sind diese Resultate nicht einfach auf das humane Modell zu übertragen. Allerdings bestärken die Entwicklung geeigneter CpG-ODN's und die positiven Ergebnisse aus dem Tiermodell den Schritt diese Untersuchungen am humanen Modell zu etablieren.

Derzeit existieren Studien, die den Einsatz von CpG-ODN in onkologischen Therapien testen. Aussichtsreiche Resultate liefern dabei Untersuchungen, die CpG-ODN in Kombination mit der bisherigen Standardtherapie testen.

Eine Phase-I-Studie beim Non-Hodgkin-Lymphom kombiniert CpG-ODN mit Rituximab bei multipel vortherafierten Patienten und konnte verbesserte Ansprechraten (24-50%) und gute Verträglichkeit bei subkutaner und systemischer Applikation verzeichnen (Leonard et al, 2007). Phase-II Studien, die CpG-ODN als Kombinationstherapeutikum einsetzen, konnten ebenfalls diese erhöhten Ansprechraten und gute Verträglichkeiten nachweisen.

Eine dieser Untersuchungen überprüfte die Wirkung der immunstimulativen DNA zusammen mit der Standardchemotherapie beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom. Die 1-Jahresüberlebensrate erhöhte sich von 33% auf 50% und die mediane Überlebensrate stieg von 6,8 Monaten auf 12,8 Monate. Ein weiterer Erfolg war, dass die therapielevanten Nebenwirkungen nicht zunahmen (Manegold et al, 2005; Manegold et al, 2008).

Zum jetzigen Zeitpunkt werden weitere Phase-I und Phase-II-Studien durchgeführt, um den Einsatz der CpG-ODN als Mono- oder Kombinationstherapie in der onkologischen Praxis zu überprüfen. Nach den Untersuchungen und Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe zum Einsatz immunstimulativer Oligodeoxynukleotide am Urothelkarzinom scheint auch hier die Übertragung ins humane Modell möglich.

Eine Option wäre die Anwendung als Mono- oder Kombinationstherapie mit bereits erprobten Chemotherapien oder als Partner der Radiochemotherapie.

Eine weitere Möglichkeit ist der Einsatz als Rezidivprophylaxe nach Tumorresektion bei nicht-muskelinvasiven Tumoren. Im Falle fortgeschrittener Stadien könnte die Therapie mit CpG-ODN eine Reduktion der Tumorlast erreichen und auch bei Versagen der Erst- oder Zweittherapie wäre die Kombination von CpG-ODN und Mitomycin oder BCG eine mögliche Therapieoption.

Trotz aller Erfolge in den verschiedenen *in-vitro* und *in-vivo* Untersuchungen ist die weitere Aufklärung des genauen Wirkmechanismus der CpG-ODN für einen erfolgreichen Einsatz im humanen Modell notwendig auch um weitere Erkenntnisse über mögliche Nebenwirkungen zu erlangen.

Es bedarf also noch weiterer Forschung, um die viel versprechenden Ergebnisse der bisherigen Untersuchungen zu untermauern und aufzuklären und damit in Zukunft CpG-ODN als effektive und effiziente Therapieoption zu etablieren.

5 Zusammenfassung

Seit einigen Jahren gilt die intravesikale Instillation von BCG als Goldstandard in der Therapie des nicht-muskelinvasiven Urothelkarzinoms (Cis, pTa, pT1). Doch obwohl BCG eine effiziente Therapie darstellt, die das Rezidivrisiko und die Tumorprogression positiv beeinflusst, leiden die Patienten häufig unter erheblichen Nebenwirkungen, die dann bis zum Therapieabbruch führen können.

Bereits in den Anfängen der BCG-Forschung gab es Vermutungen, dass BCG immunstimulatives und antineoplastisches Potential besitzt, ein Beweis oder eine Erklärung fehlten jedoch. In weiteren Untersuchungen konnten diese Eigenschaften auf bestimmte Sequenzen der prokaryontischen DNA zurückgeführt werden. Diese Sequenzen sind CG-reiche Abschnitte (sog. CpG-ODN), die immunstimulatorisches Potential besitzen und über den TLR-9 erkannt werden. Die Bindung an diesen Rezeptor induziert im murinen Modell die vermehrte Expression bestimmter Zytokine und Mediatoren, die Aktivierung von B-Zellen und NK-Zellen, sowie die Kostimulation von CD8⁺-T-Zellen. Ausserdem wird die T-Helfer-Zell-Antwort in Richtung einer Th₁-gerichteten Immunantwort verschoben.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wird die Wirkung der CpG-ODN (1668) am murinen, orthotopen Urothelkarzinommodell untersucht. Insgesamt werden 36 C57/Bl6 Mäuse eingeschlossen, von denen 24 zu zwei verschiedenen Zeitpunkten (früh/spät) CpG-ODN (1668) erhalten, während 12 Tiere als Kontrollgruppe ohne Behandlung fungieren. Nach Entnahme der Harnblasen und Lymphknoten am Ende der Versuchsreihe, untersuchen wir mittels Real-Time-PCR die Expression verschiedener Zytokine in den Gewebeproben. Von Interesse ist dabei, ob, abhängig vom Behandlungsschema eine Th₁- oder Th₂-dominierte Immunantwort durch eine erhöhte Zytokinexpression feststellbar ist.

Tiere, die eine Behandlung mit CpG-ODN (1668) erhalten weisen eine erhöhte Expression der Th₂-Zytokine auf, welche in der früh behandelten Gruppe deutlich höher als in der spät behandelten Gruppe ist. Die Zytokine der Th₁-gewichteten Immunantwort dagegen sind in beiden Behandlungsgruppen vermindert. Wir führen diese Zytokinverteilung auf den Beginn der Behandlung mit CpG-ODN (1668) zurück und gehen davon aus, dass bei den Tieren der Behandlungsgruppe die Th₁-basierte Immunantwort bereits abgelaufen ist.

Ein weiteres wichtiges Ergebnis liefert die Untersuchung der gleichzeitig entnommenen Lymphknoten. Denn obwohl die Behandlung mit CpG-ODN nur lokal in der Blase erfolgt, lassen sich in ähnliche Zytokinkonzentrationen in den peripheren Lymphknoten nachweisen. Mit diesen Ergebnissen können wir zeigen, dass CpG-ODN nicht nur lokal, sondern auch systemisch wirken. Wie dieser Wirkmechanismus funktioniert und vermittelt wird, ist noch nicht endgültig aufgeklärt und derzeit noch Gegenstand der Forschung.

In Zukunft scheint die Anwendung von CpG-ODN in der onkologischen Therapie nicht nur in der Behandlung des Urothelkarzinoms viel versprechend. Es gibt unterschiedliche Überlegungen zur Verwendung der immunstimulativen Oligodeoxynukleotide in verschiedenen Tumorstadien, auch bezüglich ihres Einsatzes als Mono- oder Kombinationstherapie. Da aber die bisherigen Ergebnisse auf Untersuchungen im Tiermodell basieren, wird in aktuellen Studien die Wirkung von CpG-ODN an humanen Zellen erforscht.

Auch andere medizinische Bereiche beschäftigen sich intensiv mit den sog. TLR-9-Agonisten, besonders im Bereich der Infektiologie und Allergologie könnte der Einsatz von CpG-ODN in Zukunft eine potente Therapieoption bilden.

Es bleibt zu hoffen, dass die Forschung um diese Substanzgruppe vorangetrieben wird und weiterhin positive Ergebnisse liefert, um durch die Aufklärung des Wirkmechanismus und Aufdeckung von Gefahren und Nebenwirkungen einen Einsatz in der medizinischen Praxis zu ermöglichen.

Abstract:

Intravesical BCG installation is established and efficient in the prophylaxis of recurrent intermediate and high-risk transitional cell carcinoma (TCC) but its mode of action has not yet been elucidated.

Diverse studies could show that this effect is based on the structure of the bacterial DNA: Small CpG-oligonucleotides (CpG-ODN) containing a central unmethylated CpG motif are able to mimic the immunostimulatory activity. Recent work proved the efficacy of synthetic CpG-ODN as an inducer for a strong Th₁-response and there is evidence for a direct and/or adjuvant antineoplastic effect.

Purpose of this work was to examine the effects of cytokine expression in the murine bladder and local lymphnodes after intravesical instillation of CpG-ODN in an orthotopic bladder cancer model.

An orthotopic C57/Bl6 murine bladder cancer model was established in female C57/BL6 mice using the corresponding syngenic MB49 TCC cell line. Mice were divided in three groups (n = 12). The first group (early-onset) received CpG-ODN directly after instillation of MB49 TCC cell line, the second group (late-onset) were treated with CpG-ODN five days after tumorcell instillation where as the last group served as control-group and received no treatment. Mice were sacrificed 13 days after tumorcell instillation and urinary bladder and local lymphnodes were used for the further examinations.

We evaluated the expression of Th₁-based cytokines (IL 12, IFN γ , and TGF β) and Th₂-based cytokines (TNF- α , IL-4 and IL 10) in these two tissues using quantitative real-time-PCR.

Repeated intravesical instillation of CpG-ODN in orthotopic murine tumor bearing urinary bladders results in significant upregulation of both Th₁- and Th₂-cytokines. Furthermore these effects are detectable in local lymphnodes.

CpG-ODN treated animals demonstrate an upregulation of Th₂-cytokines, which is even stronger in the early-onset-group than in the late-onset-group. This fact is probably due to the schedule of the CpG-treatment. Early or late onset of CpG-ODN instillation after inoculation of tumorcells seems to have no greater

effects. Examinations of local lymphnodes present similar results. Although CpG-ODN is only locally instilled in urinary bladder the cytokine regulation in lymphnodes follow the same tendency. These results suggest that CpG-ODN has not only local, but also systemic immunological effects.

CpG-ODN seem to have promising antineoplastic potential. They exert a pronounced immunological response in the cancerous murine urinary bladder and in local lymphnodes. The mechanism of action appears to be mediated immunologically. In the orthotopic tumor model up-regulation of Th₁- and Th₂ - cytokines parallels the clinical effects recently described. Investigations in human bladder cancer will have to determine the therapeutic potential of CpG-ODN in this disease.

6 Literaturverzeichnis

- Ahmad-Nejad P, Häcker H, Rutz M, Bauer S, Vabulas RM, Wagner H.
Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments.
Eur J Immunol. 2002 Jul;32(7):1958-68.
- Albers P, Heidenreich A (Hrsg).
Standardoperationen in der Urologie
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York; 2006
- Amling CL.
Diagnosis and management of superficial bladder cancer
Curr Probl Cancer 2001, 25:219-278
- Baines J, Celis E.
Immune-mediated tumor regression induced by CpG-containing oligodeoxynucleotides.
Clin Cancer Res 2003; 9:2693-2700.
- Babjuk M, Oosterlink W, Sylvester R, Kaasinen E, Böhle A, Palou J.
Guidelines on TaT1 (non-muscle invasive) bladder cancer.
EAU Guidelines 2008 edition, 2008; p.: 2-20;
- Bassi P, Ferrante GD, Piazza N, Spinadin R, Carando R, Pappagallo G, Pagano F.
Prognostic factors of outcome after radical cystectomy for bladder cancer: a retrospective study of a homogeneous patient cohort.
J Urol. 1999 May;161(5):1494-7.

Bauer S, Kirschning CJ, Hacker H, Redecke V, Hausmann S, Akira S, Wagner H, Lipford GB.

Human TLR 9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition.

Proc Natl Acad Sci USA 2001b, 24: 24;

Bendigs S, Salzer U, Lipford GB, Wagner H, Heeg K.

CpG-oligodeoxynucleotides co-stimulate primary T cells in the absence of antigen- presenting cells.

Eur.J.Immunol. 1999,1209-18.

Bichler KH (Hrsg).

Interdisziplinäres Tumorzentrum der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
Empfehlungen zu Diagnose, Therapie und Nachsorge 2001

Bird AP.

CpG-rich islands and the function of DNA methylation

Nature 1986, 209-213;

Biron CA, Cousens LP, Ruzek MC, Su HC, Salazar-Mather TP.

Early cytokine responses to viral infections and their roles in shaping endogenous cellular immunity.

Adv Exp Med Biol. 1998;452:143-9.

Böcker W, Denk H, Heitz PU.

Pathologie

3.Auflage, Urban&FischerVerlag (2004), p.870-874

Bohle B, Jahn-Schmid B, Maurer D, Kraft D, Ebner C.

Oligodeoxynucleotides containing CpG motifs induce IL-12, IL-18 and IFN-gamma production in cells from allergic individuals and inhibit Ig-E synthesis in vitro

Eur. J.Immunol. 1999:2344-53.

Böhle A, Gerdes J, Ulmer AJ, Hofstetter AG, Flad HD.

Effects of local bacillus Calmette-Guerin therapy in patients with bladder carcinoma on immunocompetent cells of the bladder wall.

J Urol 1990, 144:53-58. ;

Böhle, A.

Das Harnblasenkarzinom. Diagnostik, organerhaltende Therapie, Rezidivprohylaxe

Urologe 1997, B37:400-413;

¹Böhle A, Brandau S.

Immune mechanisms in bacillus Calmette-Guerin immunotherapy for superficial bladder cancer.

J Urol. 2003 Sep;170(3):964-9. Review.

²Böhle A, Jocham D, Bock PR.

Intavesical bacillus Calmette-Guerin versus mitomycin C for superficial bladder cancer: a formal meta-analysis of comparative studies on recurrence and toxicity.

J Urol 2003; 169(1): 90–95

Brandau S, Suttman H.

Thirty years of BCG immunotherapy for non-muscle invasive bladder cancer: a success story with room for improvement.

Biomed Pharmacother 2007; 61:299-305.

Dalbagni G.

The management of superficial bladder cancer.

Nat Clin Pract Urol. 2007 May;4(5):254-60

Dalpke A, Zimmermann S, Heeg K.

CpG-oligonucleotides in vaccination: signaling and mechanisms of action.

Immunobiology 2001; 204:667-676.

Dasari P, Nicholson IC, Hodge G, Dandie GW, Zola H.

Expression of toll-like receptors on B lymphocytes.

Cell Immunol 2005; 236:140-145.

De Boer EC, De Jong WH, Steerenberg PA, Aarden LA, Tetteroo E, De Groot ER, Van der Meijden AP, Vegt PD, Debruyne FM, Ruitenberg EJ.

Induction of urinary interleukin-1 (IL-1), IL-2, IL-6, and tumour necrosis factor during intravesical immunotherapy with bacillus Calmette-Guérin in superficial bladder cancer.

Cancer Immunol Immunother 1992; 34:306-312.

De Boer EC, Rooijackers SJ, Schamhart DH, Kurth KH.

Cytokine gene expression in a mouse model: the first instillations with viable bacillus Calmette-Guerin determine the succeeding Th1 response.

J Urol 2003, 170:2004-2008.

Decker T, Peschel C.

Effect of immunostimulatory CpG-oligonucleotides in chronic lymphocytic leukemia B cells.

Leuk Lymphoma 2001; 42:301-307.

Dittmer U, Olbrich RM A.

Treatment of infectious diseases with immunostimulatory
oligodeoxynucleotides containing CpG motifs
Cur Opin in Microbiology 2003, 6:472-477

Flam T, Amsellem-Ouazana D, Ameer A, Husson E.

Mémento Urologie-2ième edition
Maloine, Paris, France, (2002) p.227-251;

Fossa SD, Berner A.

Clinical significance of the "palpable mass" in patients with muscle-
infiltrating bladder cancer undergoing cystectomy after preoperative
radiotherapy.
Br J Urol 1991,67:54-60

Ganten D, Ruckpaul K. (Hrsg)

Molekularmedizinische Grundlagen von nicht-hereditären
Tumorerkrankungen
1. Auflage (2002), Springer Verlag, p.291-328

Gemsa D, Kalden JR, Resch K (Hrsg.).

Immunologie-Grundlagen, Klinik, Praxis
4. Auflage Thieme Verlage, 1997;

Gruenbaum Y, Stein R, Cedar H, Razin A.

Methylation of CpG sequences in eukaryotic DNA.
FEBS Lett. 1981 Feb 9;124(1):67-71.

Günther JH, Jurczok A, Wulf T, Brandau S, Deinert I, Jocham D, Böhle A.

Optimizing synergistic orthotopic murine bladder cancer (MB 49)
Cancer Research, 1999; 2864-2837;

Günther JH, Jurczok A, Werner H, Jocham D, Böhle A.

Optimal treatment of systemic bacillus Calmette-Guérin infection-
Investigations in an animal model

J.Urol., 2002; 826-831;

Hashimoto C, Hudson KL, Anderson KV.

The Toll gene of Drosophila, required for dorsal-ventral embryonic polarity,
appears to encode a transmembrane protein.

Cell 1988, 52:269-279.

Hartmann G, Krieg AM.

Mechanism and function of a newly identified CpG DNA motif in human
primary B cells. *J Immunol* 2000; 164:944-953.

Hautmann S, Huland H (Hrsg.)

Urologie.

Springer Medizin Verlag Heidelberg 2006: 202-212;

Heckelsmiller K, Rall K, Beck S, Schlamp A, Seiderer J, Jahrsdörfer B, Krug A,
Rothenfusser S, Endres S, Hartmann G.

Peritumoral CpG DNA elicits a coordinated response of CD8 T cells and
innate effectors to cure established tumors in a murine colon carcinoma
model.

J Immunol 2002; 169:3892-3899.

Hegele A, Heidenreich A, Varga Z, von Knobloch R, Olbert P, Kropf J,
Hofmann R.

Cellular fibronectin in patients with transitional cell carcinoma of the
bladder.

Urol Res 2003, 30:363-366;

- Hegele A¹, Dalpke A, Barth P, Varga Z, Heeg K, Hofmann R, Olbert P.
Antineoplastic effect of immunostimulatory DNA (CpG-ODN) in a murine C57-BL6/MB-49 transitional cell carcinoma model.
Anticancer Res 2004; 24:2225-2230.
- Hegele² A, Dalpke A, von Knobloch R, Heeg K, Hofmann R, Olbert P.
No pro-apoptotic effect of immunostimulatory DNA (CpG-ODN) on MB-49 transitional cell carcinoma cells in vitro
Eur Urol 2004, 3:211.
- Hegele, A., Dalpke, A., Heeg, K., Barth, P., Varga, Z., Hofmann, R., Olbert, P.
Immunostimulatory CpG Oligonucleotides Reduce Tumor Burden after Intravesical Administration in an Orthotopic Murine Bladder Cancer Model
TumorBiology 2005, 26: 274-280;
- Hegele A, Hofmann R (Hrsg.).
Bildatlas Zystoskopie. In: Endoskopische Urologie - Atlas und Lehrbuch
Springer-Verlag 2005: p. 31-40;
- Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S.
A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA.
Nature 2000, 408:740-745.
- Henault M, Lee LN, Evans GF, Zuckerman SH.
The human Burkitt lymphoma cell line Namalwa represents a homogenous cell system characterized by high levels of Toll-like receptor 9 and activation by CpG- oligonucleotides.
J Immunol Methods 2005; 300:93-99.

Heney NM

Natural history of superficial bladder cancer. Prognostic features and long term disease course

Urol Clin North Am 1992,19: 429-433;

Hermanek, P. and Sobin, L.H

UICC TNM Classification of malignant tumors

Springer Verlag, 2002;

Hussain I, Kline JN.

CpG oligodeoxynucleotides in asthma.

Curr Opin Investig Drugs 2001; 2:914-918.

Integrated solutions-Real-Time PCR Applications Critical Factors for successful

Real-Time PCR, Qiagen, 01/2004

Jakse G, Algaba F., Fossa S., Stenzl A., Sternber C.

Guidelines on Bladder cancer- Muscle-invasive and Metastatic

European Association of Urology , 2007: p. 2-24

Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M., Shlomchik M.

Immunologie 5.Auflage

Spektrum Akademischer Verlag GmbH, 2002;

Jemal A, Murray T, Ward E, et al:

Cancer statistics, 2005.

CA Cancer J Clin 2005,55:10-30;

Jensen K.E., Neal A.L., Owens, R.E., Warren J.

Interferon Responses of Chick Embryo Fibroblasts to Nucleid Acids and Related Compounds

Nature 200 (1963): 433-434;

Jocham, D., Miller, K. (Hrsg.)

Praxis der Urologie-in zwei Bänden , 2. überarbeitete Auflage (2003),
Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, p.105-166;

Jones SJ, Campbell SC

Non-muscle-invasive bladder cancer (Ta,T1, and CIS)

In: Urology, Campbell-Walsh (editors), El-Sevier 2008, p. 2447-2467

Kadowaki N, Ho S, Antonenko S, Malefyt RW, Kastelein RA, Bazan F, Liu YJ.

Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like
receptors and respond to different microbial antigens.

J Exp Med. 2001 Sep 17;194(6):863-9.

Kausch I, Jocham D.

Maligne Tumoren der Harnblase.

In: Praxis der Urologie; Jocham D, Miller K (Hrsg.). Stuttgart-New York:
Georg Thieme Verlag 2007: 63-120.

Kawai T, Akira S:

TLR signalling. Cell Death and Differentiation

(2006) 13, 816–825. doi:10.1038/sj.cdd.4401850, published online
20. January 2006;

Kawarada Y, Ganss R, Garbi N, Sacher T, Arnold B, Hämmerling GJ.

NK- and CD8(+) T cell-mediated eradication of established tumors by
peritumoral injection of CpG-containing oligodeoxynucleotides.

J Immunol 2001; 167:5247-5253.

Kienle GS, Kiene H.

Die Coley´sche Fiebertherapie der Krebserkrankung – historischer
Markstein oder heute noch Vorbild ?

Der Merkurstab 2003, 56:355-364. ;

Kirkali Z, Chan T, Manoharan M, Algaba F, Busch C, Cheng L, Kiemeny L, Kriegmair M, Montironi R, Murphy WM, Sesterhenn IA, Tachibana M, Weider J.

Bladder cancer: epidemiology, staging and grading, and diagnosis.
Urology 2005, 66:4-34;

von Knobloch R, Brandt H, Schrader AJ, Heidenreich A, Hofmann R

Molecular serological detection of DNA alterations in transitional cell carcinoma is highly sensitive and stage independent.
Clin Cancer Res. 2004 Feb 1;10(3):988-93.

Kranzer K, Bauer M, Lipford GB, Heeg K, Wagner H, Lang R.

CpG-oligodeoxynucleotides enhance T-cell receptor-triggered interferon-gamma production and up-regulation of CD69 via induction of antigen-presenting cell-derived interferon type I and interleukin-12.
Immunology 2000,170-8.

Krieg AM, Yi AK, Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R, Koretzky GA, Klinman DM.

CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation.
Nature 1995,546-9;

Krieg AM.

CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects.
Annu Rev Immunol. ; 2002; 20:709-760.

Krieg, AM

Antiinfective Applications of Toll-like Receptor 9 Agonists
Proc Natl Acad Sci USA, Vol.4 (2007): 289-294;

Krug A, Towarowski A, Britsch S, Rothenfusser S, Hornung V, Bals R, Giese T, Engelman H, Endres S, Krieg AM, Hartmann G.

Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12.

Eur J Immunol. 2001 Oct;31(10):3026-37.

Lamm DL, Steg A, Boccon-Gibod L, Morales A, Hanna MG Jr, Pagano F, Alfthan O, Brosman S, Fisher HA, Jakse G, et al.

Complications of Bacillus Calmette-Guerin immunotherapy: review of 2602 patients and comparison of chemotherapy complications.

Prog Clin Biol Res 1989; 310:335-355.

Lamm DL, Blumenstein BA, Crissman JD, Montie JE, Gottesman JE, Lowe BA, Sarosdy MF, Bohl RD, Grossman HB, Beck TM, Leimert JT, Crawford ED.

Maintenance bacillus Calmette-Guerin immunotherapy for recurrent TA, T1 and carcinoma in situ transitional cell carcinoma of the bladder: a randomized Southwest Oncology Group Study.

J Urol 2000; 163:1124-1129.

Leitlinie zur Diagnostik des Blasenkarzinoms-Deutsche Gesellschaft für Urologie

Urologe A, AWMF-Leitlinie Nr. 043/015

Leonard JP, Link BK, Emmanouilides C, Gregory SA, Weisdorf D, Andrey J, Hainsworth J, Sparano JA, Tsai DE, Horning S, Krieg AM, Weiner GJ.

Phase I trial of toll-like receptor 9 agonist PF-3512676 with and following rituximab in patients with recurrent indolent and aggressive non Hodgkin's lymphoma.

Clin Cancer Res 2007; 13:6168-6174.

Liang H, Nishioka Y, Reich CF, Pisetsky DS, Lipsky PE.

Activation of human B cells by phosphorothioate oligodeoxynucleotides.

J Clin Invest. 1996 Sep 1;98(5):1119-2

Lipford GB, Bendigs S, Heeg K, Wagner H.

Poly-guanosine motifs costimulate antigen-reactive CD8 T cells while bacterial CpG DNA affect T-cell activation via antigen-presenting cell-derived cytokines.

Immunology 2000;46-52.;

Ljunggren HG, Karre K.

In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition.

Immunol.Today 1990;237-44.

Male, David

Immunologie auf einen Blick

Urban&Fischer Verlag, 2005

Manegold C, Leichmann G, Gravenor D, Woytowicz D, Mezger J, Albert G, Schmalbach T, Al-Adhami M.

Addition of PF-3512676 (CpG 7909) to a Taxane/Platinum regimen for first-line treatment of unresectable non-small cell lung cancer (NSCLC) improves objective response – Phase II clinical trial.

Eur J Cancer Suppl 2005, 3:326 (A1131).

Manegold C, Gravenor D, Woytowicz D, Mezger J, Hirsh V, Albert G, Al-Adhami M, Readett D, Krieg AM, Leichman CG.

Randomized phase II trial of a toll-like receptor 9 agonist oligodeoxynucleotide, PF-3512676, in combination with first-line taxane plus platinum chemotherapy for advanced-stage non-small-cell lung cancer.

J Clin Oncol. 2008 Aug 20;26(24):3979-86.

Mason KA, Neal R, Hunter N, Ariga H, Ang K, Milas L.

CpG oligodeoxynucleotides are potent enhancers of radio- and chemoresponses of murine tumors.

Radiother Oncol 2006; 80:192-198.

McAveney KM, Gomella LG, Lattime EC.

Induction of TH1- and TH2-associated cytokine mRNA in mouse bladder following intravesical growth of the murine bladder tumor MB49 and BCG immunotherapy.

Cancer Immunol Immunother 1994, 39:401-406. ;

Medema JP, Borst J.

T cell signaling: a decision of life and death.

Hum Immunol. 1999 May;60(5):403-11. Review.

Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr.

A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity.

Nature. 1997 Jul 24;388(6640):394-7.

Messina, J. P., Gilkeson, G. S. und Pisetsky, D. S.:

Stimulation of in vitro murine lymphocyte proliferation by bacterial DNA.

J Immunol 1991, 147: 1759-64 ;

Messina, J. P., Gilkeson, G. S. und Pisetsky, D. S.:

The influence of DNA structure on the in vitro stimulation of murine lymphocytes by natural and synthetic polynucleotide antigens.

Cell Immunol 1993, 147: 148-57 ;

Millán-Rodríguez F, Chéchile-Toniolo G, Salvador-Bayarri J, Palou J, Vicente-Rodríguez J.

Multivariate analysis of the prognostic factors of primary superficial bladder cancer.

J Urol. 2000 Jan;163(1):73-8;

Mini Opticon™ System - For Real-Time PCR Detection;

Operations manual; Supports Opticon Monitot™ Version 3.1;

Catalog numer CFB- 312o

http://www.bio-rad.com/cmc_upload/Literature/185969/Bulletin_10954.pdf

Morales A, Eidingen D, Bruce AW.

Intracavitary Bacillus Calmette-Guerin in the treatment of superficial bladder tumors.

J Urol 1976, 116:180

Moretta L, Bottino C, Pende D, Mingari MC, Biassoni R, Moretta A.

Human natural killer cells: their origin, receptors and function.

Eur.J.Immunol. 2002,1205-11. ;

Muraille E, Leo O.

Revisiting the Th1/Th2 paradigm.

Scand J Immunol. 1998 Jan;47(1):1-9.

Murta-Nascimento C, Schmitz-Dräger BJ, Zeegers MP, Steineck G, Kogevinas M, Real FX, Malats N.

Epidemiology of urinary bladder cancer: from tumor development to patient's death.

World J Urol 2007, 25:285-95

Muzio, M, Polentarutti,N., Bosisio,D., Manoj Kumar, P.P., Mantovani,A.,
Toll-like receptor family and signalling pathway
Biochemical Society Transactions, Vol.28 part 5., 2000, p.563-566;

Neumann, J (Hrsg.).
Immunbiologie - Eine Einführung
Springer-Verlag, 2008

Ninalga C, Loskog A, Klevenfeldt M, Essand M, Tötterman TH.
CpG oligonucleotide therapy cures subcutaneous and orthotopic tumors
and evokes protective immunity in murine bladder cancer.
J Immunother. 2005 Jan-Feb;28(1):20-7.

O'Flynn JD, Smith JM, Hanon JS
Transurethral resection for the assessment and treatment of vesical
neoplasms : a review of 840 consecutive cases.
Eur Urol (1975) 1:38-40;

Olbert P, Dalpke A, von Knobloch R, Heeg K, Hofmann R, Hegele A:
Toll-like receptor expression in MB-49 transitional cell carcinoma cells in
culture
Onkologie 2004; 27: 146

Olbert P, Schrader AJ, Hofmann R, Hegele A
Immunstimulative CpG-Oligodeoxynukleotide im orthotopen murinen
Transitionalzellkarzinom-Modell- Effekt auf die lokale Zytokinexpression
Urologe 2008-47:1133-1136

- Olbert P, Schrader AJ, Simon C, Dalpke A, Barth P, Hofmann R, Hegele A:
In Vitro and In Vivo Effects of CpG-Oligodeoxynucleotides (CpG-ODN) on
Murine Transitional Cell Carcinoma and on the Native Murine Urinary
Bladder Wall
Anti Cancer Research 2009, 29: 6
- Oosterlinck W, Lobel B, Jakse G, Malmström PU, Stöckle M, Sternberg C,
European Association of Urology (EAU) Working Group on Oncological
Urology.Guidelines on bladder cancer.
Eur Urol 2002, 41:105-112;
- Oosterlinck W., van der Meijden A., Sylvester R.,Böhle A., Rintala E., Solsona
Narvón E., Lobel A.
Guidelines on TaT1 (non-muscle invasive) bladder cancer.
EAU Guidelines, Pocket 2007, 3-16;
- Pagano F, Bassi P, Galetti TP, Meneghini A, Milani C, Artibani W, Garbeglio
A.
Results of contemporary radical cystectomy for invasive bladder cancer: a
clinicopathological study with an emphasis on the inadequacy of the
tumor, nodes and metastases classification.
J Urol. 1991 Jan,145(1):45-50;
- Paik ML, Scolieri MJ, Brown SL, Spirnak JP, Resnick MI.
Limitations of computerized tomography in staging invasive bladder
cancer before radical cystectomy.
J Urol 2000, 163:1693-1696;
- Pearl R.
Cancer and tuberculosis.
Am J Hyg 1929, 9:97-100.

Pedersen G, Andresen L, Matthiessen MW, Rask-Madsen J, Brynskov J.
Expression of Toll-like receptor 9 and response to bacterial CpG
oligodeoxynucleotides in human intestinal epithelium.
Clin Exp Immunol 2005; 141:298-306.

¹Pfaffl, M.W.

Quantification strategies in real-time RT-PCR
The real-time PCR Encyclopaedia A-Z of quantitative PCR.
International University Line (Bustin, St. A. ed.),
La Jolla, CA, (2004) S. 87-120

²Pfaffl, M.W.:

Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung
BIOspektrum, Sonderausgabe PCR, 10 (2004) S. 92-95

Platz J, Beisswenger C, Dalpke A, Koczulla R, Pinkenburg O, Vogelmeier C,
Bals R.

Microbial DNA induces a host defense reaction of human respiratory
epithelial cells.
J Immunol 2004; 173:1219-1223.

Prescott S, James K, Hargreave TB, Chisholm GD, Smyth JF.

Radio-immunoassay detection of interferon-gamma in urine after
intravesical Evans BCG therapy.
J Urol 1990; 144:1248-1251

Prescott,S., Jackson, A.M.,Hawkyard, S.J., Alexandroff, A.B., James K.

Mechanisms of Action of Intravesical Bacille Calmette-Guérin: Local
Immune Mechanisms
Clin Infect Dis. 2000 Sep,31 Suppl 3:S91-3

Ratliff TL, Haaff EO, Catalona WJ.

Interleukin-2 production during intravesical bacille Calmette-Guerin therapy for bladder cancer.

Clin Immunol Immunopathol 1986; 40:375-379.

Ratliff TL, Gillen D, Catalona WJ.

Requirement of a thymus dependent immune response for BCG-mediated antitumor activity.

J Urol 1987, 137:155-158.

Real Time PCR, Applications guide

Bio-Rad Laboratories, Inc. © 2005

Res P, Spits H.

Developmental stages in the human thymus

Semin Immunol. 1999 Feb;11(1):39-46

Rödter K, Ollanas R, Fisch M.

Harnableitung - was ist möglich?

Wissenschaft und Praxis, hdb 5/08, S. 20 - 23

Robert Koch Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.(Hrsg.)

Krebs in Deutschland 2003-2004. Häufigkeiten und Trends

Seite 80-83; Berlin 2008

Rogers PR, Huston G, Swain SL.

High antigen density and IL-2 are required for generation of CD4 effectors secreting Th1 rather than Th0 cytokines.

J Immunol. 1998 Oct 15;161(8):3844-52.

Schips L, Augustin H, Zigeuner RE, Gallé G, Habermann H, Trummer H, Pummer K, Hubmer G.

Is repeated transurethral resection justified in patients with newly diagnosed superficial bladder cancer?

Urology 2002, 59:220-223;

Schmitt E, Germann T, Goedert S, Hoehn P, Huels C, Koelsch S, Kühn R, Müller W, Palm N, Rüde E.

IL-9 production of naive CD4+ T cells depends on IL-2, is synergistically enhanced by a combination of TGF-beta and IL-4, and is inhibited by IFN-gamma.

J Immunol. 1994 Nov 1;153(9):3989-96.

Siegal FP, Kadowaki N, Shodell M, Fitzgerald-Bocarsly PA, Shah K, Ho S, Antonenko S, Liu YJ.

The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood.

Science. 1999 Jun 11;284(5421):1835-7.

Seder RA, Boulay JL, Finkelman F, Barbier S, Ben-Sasson SZ, Le Gros G, Paul WE.

CD8+ T cells can be primed in vitro to produce IL-4.

J Immunol. 1992 Mar 15;148(6):1652-6.

Smith JA Jr, Whitmore WF Jr.

Regional lymph node metastasis from bladder cancer.

J Urol 1981; 126:591-593

Suttman H, Riemensberger J, Bentien G, Schmaltz D, Stöckle M, Jocham D, Böhle A, Brandau S.

Neutrophil granulocytes are required for effective Bacillus Calmette-Guérin immunotherapy of bladder cancer and orchestrate local immune responses.

Cancer Res 2006, 66:8250-8257

Sparwasser, T., Miethke, T. und Lipford, G. B.

Makrophages Sense Pathogens via DNA Motifs: Induction of Tumor Necrosis Factor- Alpha-Mediated Shock

Eur. J. Immunol. 27 (1997) 1671-1679

Sternberg CN, Yagoda A, Scher HI, Watson RC, Ahmed T, Weiselberg LR, Geller N, Hollander PS, Herr HW, Sogani PC, et al.

Preliminary results of M-VAC (methotrexate, vinblastine, doxorubicin and cisplatin) for transitional cell carcinoma of the urothelium.

J Urol 1985; 133:403-437.

Sylvester RJ, Oosterlinck W, van der Meijden AP.

A single immediate postoperative instillation of chemotherapy decreases the risk of recurrence in patients with stage Ta T1 bladder cancer: a meta-analysis of published results of randomized clinical trials.

J Urol. 2004 Jun;171(6 Pt 1):2186-90;

Sylvester RJ, van der Meijden AP, Oosterlinck W, Witjes JA, Bouffieux C, Denis L, Newling DW, Kurth K.

Predicting recurrence and progression in individual patients with stage Ta T1 bladder cancer using EORTC risk tables: a combined analysis of 2596 patients from seven EORTC trials

Eur Urol 2006, 49:466-475;

Sylvester RJ, van der Meijden AP, Lamm DL.

Intravesical bacillus Calmette-Guerin reduces the risk of progression in patients with superficial bladder cancer: a meta-analysis of the published results of randomized clinical trials.

J Urol 2002, 168:1964-1970;

Thalmann GN, Sermier A, Rentsch C, Möhrle K, Cecchini MG, Studer UE.

Urinary Interleukin-8 and 18 predict the response of superficial bladder cancer to intravesical therapy with bacillus Calmette-Guerin.

J Urol 2000; 164:2129-2133.

Tokunaga T, Yamamoto H, Shimada S, Abe H, Fukuda T, Fujisawa Y,

Furutani Y, Yano O, Kataoka T, Sudo T,

Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from Mycobacterium bovis BCG. Isolation, physicochemical characterization, and antitumor activity.

J.Natl.Cancer Inst. 1984, 955-62;

Tokunaga,T.,Yano,O., Kuramoto,E., Kimura,Y.,Yamamoto,T.,Kataoka,T., Yamamoto,S.

Synthetic Oligonucleotids with particular Base Sequences from cDNA Encoding Proteins of Myobacterium bovis BCGInduce Interferons and Activate Natural Killer Cells

Microbiol Immunol. 1992,36(1):55-66;

Wang H, Rayburn E, Zhang R.

Synthetic oligodeoxynucleotides containing deoxycytidyl-deoxyguanosine dinucleotides (CpG ODNs) and modified analogs as novel anticancer therapeutics.

Curr Pharm Des 2005; 11:2889-2907.

Wijkstrom H, Lagerkvist M, Nilsson B, et al:

Evaluation of clinical staging before cystectomy in transitional cell bladder carcinoma: A long-term follow-up of 276 consecutive patients.

Br J Urol 1998;81:686-691;

Witjes JA, Hendricksen K.

Intravesical Pharmacotherapy for Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer: A Critical Analysis of Currently Available Drugs, Treatment Schedules, and Long-Term Results.

Eur Urol. 2008, 53:45-52;

Wooldridge JE, Weiner GJ.

CpG DNA and cancer immunotherapy: orchestrating the antitumor immune response.

Curr Opin Oncol 2003; 15:440-445.

¹Yamamoto S, Yamamoto T, Shimada S, Kuramoto E, Yano O, Kataoka T, Tokunaga T.

DNA from Bacteria but not from vertebrates, induces interferons, activates natural killer cells and inhibits tumor growth

Microbiol. Immunol. 36 (9)(1992) 983-997

²Yamamoto S, Yamamoto T, Kataoka T, Kuramoto E, Yano O, Tokunaga T.

Unique palindromic sequences in synthetic oligonucleotides are required to induce IFN [correction of INF] and augment IFN-mediated [correction of INF] natural killer activity.

J Immunol. 1992 Jun 15;148(12):4072-6

Yamamoto S, Kuramoto E, Shimada S, Tokunaga T 1988.

In vitro augmentation of natural killer cell activity and production of interferon- alpha/beta and -gamma with deoxyribonucleic acid fraction from Mycobacterium bovis BCG.

Jpn J Cancer Res 1998; 79:866-873.

Yi AK, Chace JH, Cowdery JS, Krieg AM.

IFN-gamma promotes IL-6 and IgM secretion in response to CpG motifs in bacterial DNA and oligodeoxynucleotides.

J.Immunol. 1996,558-64.

Yi AK, Chang M, Peckham DW, Krieg AM, Ashman RF.

CpG oligodeoxyribonucleotides rescue mature spleen B cells from spontaneous apoptosis and promote cell cycle entry.

J.Immunol. 1998,5898-906.

Yi AK, Peckham DW, Ashman RF, Krieg AM.

CpG DNA rescues B cells from apoptosis by activating NFkappaB and preventing mitochondrial membrane potential disruption via a chloroquine-sensitive pathway.

Int.Immunol. 1999,2015-24.

Zeegers MP, Kellen E, Buntinx F, van den Brandt PA.

The association between smoking, beverage consumption, diet and bladder cancer: a systematic literature review.

World J Urol 2004; 21:392-401.

Zimmermann S., Egeter O., Hausmann S., Lipford GB., Rocken M., Wagner H., Heeg K.

CpG oligodeoxynukleotides trigger protective and curativeTh1 responses in lethal murine leishmaniasis

J Immunol 1998, 160:3627-3630.

Zhang D, Zhang G, Hayden MS, Greenblatt MB, Bussey C, Flavell RA, Ghosh S.

A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria.
Science 2004, 303:1522-1526.

7 Anhang

7.1. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
APZ	Antigenpräsentierende Zellen
BAK	BCG-aktivierte Killerzelle
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
C	Cytosin
C(t)-Wert	Threshold-Cycle
CA	Karzinom
cDNA	complementary desoxyribonucleoid acid
Cis	Carcinoma in situ
CpG-ODN	Cytosin-Guanin reiche Oligodeoxynucleotide
DC	Dendritische Zelle
DNA	Desoxyribonucleoid acid
DNS	Desoxyribonuklein Säure
EAU	European Association of Urology
Eff	Effizienz
G	Guanin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
Ggf.	Gegebenenfalls
HKG	Housekeeping Gen

ICAM	Intercellular adhesion molecule
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IRAK	Interleukin-1 receptor activated kinase
KG	Körpergewicht
MHC	Major histocompatibility complex
MHPRT	Mouse Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
MW	Mittelwert
MyD88	Myeloid differentiation primary response gene (88)
NF-κB	Nuclear factor κB
NK	Natürliche Killerzelle
NTC	No template control
ODN	Oligodeoxynucleotide
PAMP	Pathogen associated molecular patterns
PCR	Polymerase chain reaction
PDC	Plasmazytotische dendritische Zelle
PRR	Pattern recognition receptors
Real-time PCR	Real-time polymerase chain reaction
Sog.	sogenannte

T	Thymin
Tab	Tabelle
Tbc	Tuberkulose
TCR	T-cell receptor
TGF	Transfroming growth factor
Th-Zelle	T-Helfer-Zelle
TLR	Toll-like-receptor
TRAF 6	Tumor necrosis factor associated receptor 6
TUR-B	Tranurethrale Resektion der Blase
Vgl.	Vergleich
WHO	World Health Organisation
z.B.	zum Beispiel

7.3. Liste der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer während meines Studiums an der Philipps-Universität Marburg waren die Damen/Herren:

In Marburg:

Adamkiewicz	Grundmann	Mandrek	Voigt
Alfke		Max	
Arnold	Herrmann-Lingen	Moll	Wagner
Aumüller	Hasilik	Moosdorf	Weihe
	Hertl	Mueller	Werner
Barth	Hofmann	Müller	Westermann
Basler	Jungclas	Mutters	Westphal
Baum			Wulf
Becker	Kann	Neubauer	
Boudriot	Kill		
	Klenk	Oertel	
Cetin	Klose		
Christiansen	Koch	Radsak	
Czubayko	Koolmann	Remschmidt	
	Krieg	Renz	
Daut	Kroll	Richter	
	Kunz	Rieder	
Eilers		Röhm	
	Lang	Röper	
Feuser	Lenz	Rothmund	
	Lill		
Gerdes	Löffler	Schäfer	
Gotzen	Lohoff	Schrader	
Griss	Lorenz	Seitz	
Grzeschik		Seyberth	
Gudermann	Maier		

In Giessen:

Schneider

Weiler

Praktisches Jahr:

Holzgreve

Hoyer

Kann

Kienapfel

Wong

7.4. Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Rainer Hofmann für die Möglichkeit die vorliegende Arbeit an der Klinik für Urologie und Kinderurologie der Philipps-Universität Marburg anfertigen zu dürfen.

Grosser Dank gilt den beiden Betreuern dieser Arbeit: Meinem Doktorvater PD Dr. med Axel Hegele und Dr. med. Peter J. Olbert. Durch ihre engagierte Betreuung und kritische Begutachtung konnte ich diese Arbeit fertig stellen. Ihre vertrauensvolle, fachliche und persönliche Unterstützung ermöglichten mir Einblicke in die urologische Forschung, sowie Präsentationen der Arbeit auch außerhalb der Klinik. Vielen Dank Euch Beiden!

Für die Einführung in das experimentelle Arbeiten im Labor, die unermüdliche Hilfe und angenehme Zusammenarbeit danke ich Heidrun Brandt und Renate Nottelmann. Dr. Lutz Konrad gilt Dank für seine Hilfe bei der Durchführung der Labormethodik.

Julia Scholl und Marwin Klebe danke ich für ihre Motivation und Beistand bei der gemeinsamen Arbeit in Labor, Tierstall und am Schreibtisch.

Vielen Dank an Timo Paulsen für die Hilfe und Geduld bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse, sowie an Ingrid Pritzkow, Ulrike Kollmar und Konrad Schöttner für die gründliche und kritische Korrektur der Arbeit.

Als letztes gilt der grösste Dank denen, die mich während der gesamten Zeit unterstützt und motiviert haben: Meinen Eltern, Solveig und Robert, Christian, Charlotte und Corinna.